



**Isabel Mendes
da Silva**

**Desenvolvimento de uma metodologia para a análise
da composição volátil do sal marinho por
microextracção em fase sólida e cromatografia em
fase gasosa acoplada à espectrometria de massa
(SPME-GC-MS)**



**Isabel Mendes
da Silva**

**Desenvolvimento de uma metodologia para a análise
da composição volátil do sal marinho por
microextracção em fase sólida e cromatografia em
fase gasosa acoplada à espectrometria de massa
(SPME-GC-MS)**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química e Qualidade dos Alimentos, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof.^a Dr.^a Ivonne Delgadillo Giraldo

professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva (Orientador)

professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Dr.^a Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço (Orientadora)

professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Marco Diogo Richter Gomes da Silva

professor auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

agradecimentos

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Manuel António Coimbra e Prof.^a Dr.^a Sílvia Rocha, pela sua dedicação, por todo o entusiasmo e motivação que me transmitiram, assim como pelos conhecimentos e conselhos partilhados.

Pelo apoio financeiro, pelo fornecimento das amostras e por toda a informação prestada, ao Projecto SAL “Sal do Atlântico” realizado no âmbito do programa INTERREG IIIB, em especial à Prof.^a Dr.^a Filomena Martins e à Dr.^a Margarida Silva.

Ao Dr. António Barros pela sua participação neste trabalho no que diz respeito ao tratamento quimiométrico dos resultados.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Elisabete e à Juliana, por todo o apoio prestado ao longo da realização deste trabalho e pelo seu companheirismo.

À minha família, em especial aos meus pais, irmão e namorado por todo o seu apoio. O encorajamento e força que sempre me transmitiram foram preciosos.

Obrigada!

palavras-chave

Sal marinho, composição volátil, microextração em fase sólida (SPME), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

resumo

A valorização do salgado passa pela caracterização química do sal produzido, cujas características estão associadas à envolvente ambiental das marinhas e à sua origem geográfica. As características químicas de um sal marinho ainda não são completamente conhecidas, nomeadamente as que estão relacionadas com a sua composição volátil.

O objectivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de microextração em fase sólida associada à cromatografia em fase gasosa e detecção por espectrometria de massa (SPME-GC-MS) para a análise da composição volátil de sal marinho. Optou-se por usar uma fase estacionária de carbowax-divinilbenzeno (CW/DVB) com 65 μm de espessura como fibra de SPME. Os parâmetros otimizados foram i) a quantidade de amostra, ii) a temperatura de extração, iii) o modo de apresentação da amostra (sólido ou solução) e iv) a elaboração do branco da amostra (referência). Observou-se ser possível detectar e identificar compostos voláteis e semi-voláteis no sal e que a extração destes compostos era favorecida pela dissolução do sal em água e pelo aumento da temperatura de extração (entre 40 e 60°C), havendo um incremento no número de compostos identificados e nas áreas cromatográficas.

Na metodologia proposta, 40 mL de uma solução aquosa saturada com 16 g de sal são analisados num frasco de 120 mL, à temperatura de 60°C e usando um tempo de espaço de cabeça de 18 h. Esta metodologia foi aplicada a amostras de sal marinho provenientes de Aveiro (de diferentes marinhas), Castro Marim, Tavira, Guérande (França), ilha do Sal (Cabo Verde) e sal de mina proveniente de Espanha. Como referência foi usada uma amostra de sal p.a. (99,5% NaCl). Nos sais analisados foi possível identificar compostos das seguintes famílias: hidrocarbonetos, álcoois, fenóis, aldeídos, cetonas, ésteres, compostos terpénicos e norisoprenóides. O sal marinho de Aveiro foi o que apresentou um maior número de famílias e de compostos identificados, relativamente aos sais provenientes das outras origens. O sal de Espanha foi o que apresentou uma menor área cromatográfica total, o que se explica por se tratar de sal de mina, mais rico em NaCl. Uma análise por componentes principais (PCA) aos cromatogramas dos sais permitiu distinguir o sal de Guérande dos restantes, principalmente devido ao composto terpénico viridiflorol, apenas identificado neste sal e por isso considerado um potencial marcador de origem.

Os compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis identificados nos sais analisados parecem ter basicamente 3 origens: i) algas marinhas, ii) comunidade bacteriana envolvente e iii) poluição do meio. Foi ainda desenvolvido um procedimento para a quantificação da β -ionona, um composto que poderá contribuir para o aroma do sal. A presença de β -ionona nos sais analisados variou de 0,2 a 0,9 $\mu\text{g/kg}$ de sal.

keywords

Marine salt, volatile composition, solid phase microextraction (SPME), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

abstract

The valorization of the saltworks depends on the chemical characterization of the salt produced, which is associated with the saltworks' environment and their geographical origin. The chemical characteristics of marine salt are still not fully known, specially those related to its volatile composition.

The purpose of this work was to develop a solid phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC-MS) methodology to study the salt's volatile composition. In this study we choose to use an SPME fibre coated with 65 μm carbowax/divinylbenzene (CW/DVB). The optimized parameters were i) the sample quantity, ii) the extraction temperature, iii) the sample presentation (solid or in solution) and iv) the elaboration of the sample blank (reference). During the optimization of the methodology it was possible to detect and identify volatile and semi-volatile compounds in salt. The extraction of these compounds was increased by dissolution of the salt in water and by the increase of the extraction temperature (between 40 and 60°C), leading to an increase in the amount of identified compounds and of the GC peak areas.

In the proposed methodology, 40 mL of an aqueous solution saturated with 16 g of salt is analysed in a 120 mL glass vial, at 60°C and applying a headspace extraction time of 18 h. The implemented methodology was applied to marine salt from Aveiro (from different saltworks), Castro Marim, Tavira, Guérande (France), Sal island (Cape Verde) and to mine salt from Spain. A sample of NaCl p.a. was analysed as reference. On the analysed salt it was possible to identify hydrocarbons, alcohols, phenols, aldehydes, ketones, esters, terpenic compounds and norisoprenoids. The Aveiro marine salt presented the largest number of families and of identified compounds, comparing to the salts from the other origins. The salt from Spain showed the smallest total GC peak area which is explained by its higher NaCl content as a mine salt. A principal component analysis (PCA) of the salt chromatograms distinguished the salt of Guérande from the others, this distinction was mainly due to the terpenic compound viridiflorol, identified only in this salt and therefore considered as a potential marker of origin.

The compounds identified in the analysed salts seem to derive from 3 main sources: i) marine algae, ii) surrounding bacterial community and iii) environment pollution.

A procedure was also developed for the quantification of β -ionone, a compound that can be important for the salt aroma. The presence of β -ionone in the analysed salts varied from 0.2 to 0.9 $\mu\text{g/kg}$ of salt.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 SAL MARINHO ARTESANAL	3
1.2 MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (SPME-GC-MS)	9
1.2.1 <i>Microextracção em fase sólida</i>	9
1.2.2 <i>Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)</i>	13
2. OBJECTIVOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 AMOSTRAS DE SAL USADAS NESTE ESTUDO	23
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS QUANTO À PERCENTAGEM DE HUMIDADE, MATÉRIA INSOLÚVEL, CLORETO DE SÓDIO, CLORETOS TOTAIS, MAGNÉSIO, CÁLCIO E POTÁSSIO	23
3.2.1 <i>Determinação da percentagem de humidade</i>	23
3.2.2 <i>Determinação da percentagem de matéria insolúvel</i>	24
3.2.3 <i>Determinação do teor de cloreto de sódio e cloretos totais</i>	24
3.2.4 <i>Determinação do teor em magnésio, cálcio e potássio</i>	26
3.3 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE SPME-GC-MS PARA A ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DO SAL MARINHO.....	27
3.3.1 <i>Carbowax-divinilbenzeno (CW/DVB)</i>	27
3.3.2 <i>Ensaio preliminares</i>	28
3.3.3 <i>Optimização da metodologia</i>	29
3.3.4 <i>Metodologia de SPME-GC-MS desenvolvida para a análise da composição volátil de sal marinho</i>	32
3.3.5 <i>Análise das amostras por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)</i>	33
3.3.6 <i>Tratamento de dados</i>	33
3.3.7 <i>Quantificação da β-ionona nos sais</i>	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS QUANTO À PERCENTAGEM DE HUMIDADE, MATÉRIA INSOLÚVEL, CLORETO DE SÓDIO, CLORETOS TOTAIS, MAGNÉSIO, CÁLCIO E POTÁSSIO	39
4.2 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE SPME-GC-MS PARA A ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DO SAL MARINHO.....	41
4.2.1 <i>Ensaio preliminares</i>	41
4.2.2 <i>Optimização da metodologia de SPME-GC-MS para a análise da composição volátil do sal marinho</i>	44
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DO SAL DE DIFERENTES ORIGENS	51
4.3.1 <i>Composição volátil do sal marinho de Aveiro</i>	51
4.3.2 <i>Composição volátil de sal proveniente de outras origens</i>	56
4.3.3 <i>Análise por componentes principais dos cromatogramas</i>	59
4.3.4 <i>Quantificação da β-ionona</i>	65
5. CONCLUSÃO	69
6. BIBLIOGRAFIA.....	73

ABREVIATURAS

Designação em Inglês	ABREVIATURA	Designação em Português
Coefficient of variation	CV	Coefficiente de variação
Gas Chromatography	GC	Cromatografia em fase gasosa
Inductively Coupled Plasma	ICP	Espectroscopia de emissão por plasma
Minuts	min	Minutos
Mass Spectrometry	MS	Espectrometria de massa
Pro analysis	p.a.	Pró-análise
Principal component analysis	PCA	Análise por componentes principais
Rotations per minute	r.p.m.	Rotações por minuto
Solid phase microextraction	SPME	Microextração em fase sólida

1. INTRODUÇÃO

1.1 SAL MARINHO ARTESANAL

O sólido branco que denominamos vulgarmente de “sal” é uma substância química sólida à temperatura ambiente e constituída maioritariamente pelo sólido iónico cloreto de sódio (NaCl).

O sal existe na natureza e pode ser obtido a partir desta de diversas formas. O sal pode ser extraído directamente de minas de halite que se formam entre os 180 e 600 metros da superfície terrestre, pode ser obtido por evaporação da água de salmouras, que podem existir sob a forma de poços onde brota água salgada, ou resultar de água doce que é bombeada para depósitos naturais de sal e depois removida, e também pode ser obtido a partir da água do mar, nas salinas (ou marinhas), por evaporação natural da água pela acção da luz solar [1, 2]. Neste último caso, ao produto obtido, dá-se o nome de sal marinho, enquanto que para os casos anteriores este designa-se de sal-gema [2]. O sal-gema é mais desprovido de impurezas e mais rico em NaCl [2].

A salinicultura é uma das mais antigas actividades do território de Aveiro [2]. O salgado (conjunto de marinhas de uma dada região) de Aveiro, situado no estuário do Vouga, corre riscos de desaparecer de uma forma irreversível (Figura 1.1). Nas últimas décadas, com a pouca rentabilidade desta indústria, assistiu-se a um crescente abandono da actividade e à consequente destruição das marinhas [2]. Esta actividade está submetida a um vasto conjunto de pressões de diferentes ocupações territoriais, tais como a aquacultura intensiva e o tráfego de embarcações.

A envolvência territorial das salinas ao nível ambiental, assim como pela flora e fauna envolvente, conduz a produtos finais com distintas características, que se poderão diferenciar ao nível químico, microbiológico e/ou sensorial, caracterizadoras do sal marinho artesanal e das suas origens.

As salinas apresentam uma estrutura básica idêntica (Figura 1.2), variando, no entanto, as dimensões dos tanques e o seu modo de funcionamento. A água do mar que abastece as salinas (Figura 1.2-a) vai atravessando diversos tanques (Figura 1.2-b) e à medida que a água evapora vai-se tornando cada vez mais concentrada em NaCl até que se atinge o limite da solubilidade e se dá a cristalização formando-se um lençol de cristais de

INTERREG IIIB - Espaço Atlântico
Mapa de 2001 com actualização de marinhais de sal a produzir em 2005

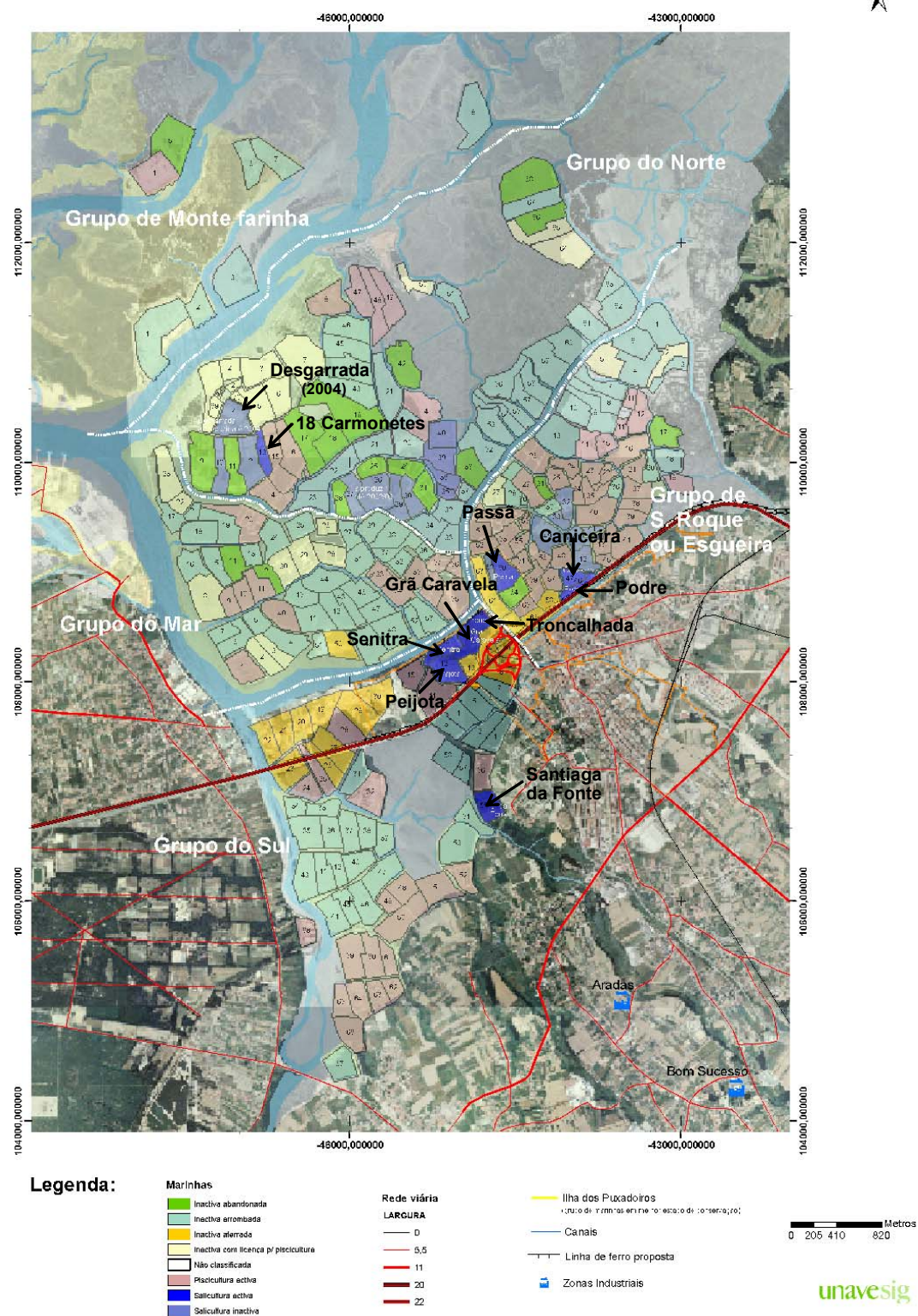


Figura 1.1 – Mapa das marinhais de Aveiro actualizado em 2005.

sal (Figura 1.2-c) [3]. A qualidade do cloreto de sódio produzido numa salina está dependente da precipitação diferencial dos sais com a variação da salinidade ao longo dos tanques [3]. Existem salinas onde também se produz a *flor de sal*, uma espécie de nata de pequenos cristais de sal que se forma à superfície da água saturada das salinas. A recolha deste sal faz-se antes que os cristais se tornem suficientemente grandes e se depositem [4].

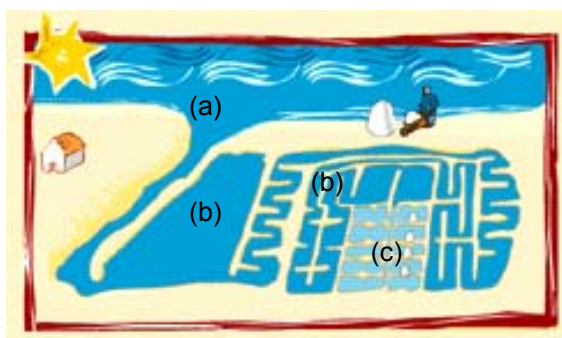
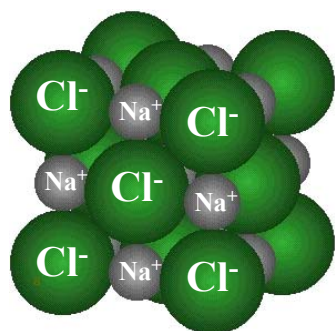


Figura 1.2 – Estrutura básica de uma salina: (a) local de abastecimento de água; (b) tanques de concentração; (c) tanques de cristalização.

(<http://www.aquasel.fr/index.asp?ID=371&idl=381>)

Na água do mar encontram-se dissolvidos diferentes sais, cujas concentrações dependem de vários factores, tais como a solubilidade, presença ou ausência de outros sais, temperatura ou pH [3]. O cloreto de sódio (Figura 1.3) é o mais abundante, no entanto, outros sais tais como brometos, carbonatos, sais de cálcio, potássio e magnésio, também podem estar presentes e precipitar simultaneamente. Como exemplo de outros sais para além do cloreto de sódio ($s^1_{(\text{NaCl})} = 35,92 \text{ g/100 g de solução}$) que precipitam numa salina, temos o carbonato de cálcio ($s_{(\text{calcite})} = 0,58 \text{ mg/100 g H}_2\text{O}$; $s_{(\text{aragonite})} = 0,68 \text{ mg/100 g H}_2\text{O}$; $s_{(\text{vaterite})} = 1,10 \text{ mg/100 g H}_2\text{O}$), os sulfatos de cálcio ($s_{(\text{CaSO}_4)} = 0,63 \text{ g/100 g de solução}$) e magnésio ($s_{(\text{MgSO}_4)} = 27,6 \text{ g/100 g de solução}$), os cloretos de potássio ($s_{(\text{KCl})} = 26,4 \text{ g/100 g de solução}$) e magnésio ($s_{(\text{MgCl}_2)} = 35,5 \text{ g/100 g de solução}$), entre outros.

¹ Solubilidade em água a 25°C.



Estrutura cristalina: cúbica de faces centradas

Raio iónico do sódio: 1,16 Å

Raio iónico do cloro: 1,67 Å

Interstícios octaédricos ($r^+ / r^- = 1,16 \text{ Å} / 1,67 \text{ Å} = 0,695$)

Figura 1.3 – Estrutura cristalina do NaCl, um cristal iónico.

(http://web.inc.bme.hu/csonka/csg/oktat/francia/inorg/nacl_comapct.jpg)

Existe uma proposta de decreto-lei de 20 de Outubro de 2005 que define as características físico-químicas e organolépticas do ‘Sal Alimentar Tal Qual’ com vista à valorização deste produto artesanal (ver anexo I). Relativamente às características físico-químicas, a proposta de decreto-lei, no que se refere ao sal marinho destinado ao consumidor final, estabelece limites para os seguintes parâmetros: % de cloreto de sódio, % de contaminantes (limites estabelecidos no Reg. (CE) nº466/2001² e no Codex Alimentarius) e % de humidade. Quanto às características organolépticas, esta proposta define o aspecto, a cor, o aroma, o sabor e a textura que um sal marinho deve apresentar [5].

Encontra-se de momento em curso o projecto *SAL “Sal do Atlântico” – Revalorização da identidade das salinas do Atlântico. Recuperação e promoção do potencial biológico, económico e cultural das zonas húmidas costeiras*, no âmbito de um programa de iniciativa comunitária implementado pela Comissão Europeia, o INTERREG IIIB. Tal como consta na designação do projecto, este visa a revalorização do produto “sal artesanal” e sobrevivência do património natural e cultural a ele associado. No âmbito deste projecto foi feita a caracterização química do sal marinho de Aveiro de 2004 (Tabela 1.1). Simultaneamente, também se realizou a caracterização química de sais provenientes de outras origens: sal marinho proveniente de Castro Marim, Tavira (flor de sal), Guérande (França), Ilha do Sal (Cabo Verde) e sal de mina proveniente de Espanha (Tabela 1.2). Foram determinados os teores de humidade, matéria insolúvel em água,

² Regulamento que estabelece limites para a presença de determinados contaminantes nos alimentos e que se aplica à Comunidade Europeia.

cloreto de sódio e cloretos totais, magnésio, cálcio, potássio, sulfatos, iodetos, nitritos e nitratos e de outros elementos químicos (Pb, Cu, As, Zn, Cd, Ni, Cr e Al). Os elementos químicos Pb, Cu, As, Zn, Cd, Ni e Cr, assim como os iodetos, não foram detectados em nenhuma amostra. Os nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) ocorrem em quantidades inferiores a 1 mg/kg e 0,1 mg/kg, respectivamente, valores que se encontram dentro dos limites admitidos na proposta de decreto-lei.

Tabela 1.1 – Caracterização química do sal marinho de Aveiro de 2004 quanto aos teores de humidade, matéria insolúvel, cloretos, sulfatos, magnésio, cálcio, potássio e alumínio (adaptado de [6]).

	% Humidade (CV)	% Mat. Insolúvel* (CV)	% NaCl* (CV)	% Cloretos* (CV)	% Sulfatos* (CV)	% Mg*	% Ca*	% K*	Al* (µg/g)
Desgarrada	6,39 (1)	0,020 (40)	96,0 (0)	58,2 (0)	- -	0,34	0,12	0,10	-
18 Carmonetes	9,09 (3)	0,127 (9)	95,0 (0)	57,6 (0)	1,10 (4)	0,72	0,09	0,19	4,82
Passã	5,98 (2)	0,139 (7)	96,1 (0)	58,3 (0)	0,81 (9)	0,23	0,19	0,08	5,84
Troncalhada	7,65 (0)	0,125 (5)	95,5 (0)	58,0 (0)	1,27 (3)	0,51	0,10	0,13	5,25
Senitra	7,02 (2)	0,631 (7)	94,7 (0)	57,5 (0)	1,37 (1)	0,36	0,21	0,10	12,69
Peijota	6,00 (1)	0,070 (17)	96,8 (0)	58,7 (0)	1,04 (1)	0,37	0,10	0,11	6,38
Grã Caravela	6,67 (1)	0,225 (4)	95,5 (0)	57,9 (0)	1,28 (12)	0,48	0,15	0,13	11,74
Santiago da Fonte	7,92 (1)	0,260 (28)	94,9 (0)	57,6 (0)	1,53 (1)	0,71	0,12	0,19	4,94

* valores calculados em relação à massa seca do sal.

Tabela 1.2 – Caracterização química quanto aos teores de humidade, matéria insolúvel, cloretos, sulfatos, magnésio, cálcio, potássio e alumínio de sal de 2004 proveniente de várias origens.

(Silva, I.; Coimbra, M. A. e Rocha, S. M., resultados não publicados)

	% Humidade (CV)	% Mat. Insolúvel* (CV)	% NaCl* (CV)	% Cloretos* (CV)	% Sulfatos* (CV)	% Mg*	% Ca*	% K*	Al* (µg/g)
Castro Marim	3,43 (6)	0,013 (37)	97,3 (0)	59,0 (0)	1,10 (3)	0,41	0,05	0,17	-
Tavira	6,97 (3)	0,030 (3)	94,6 (1)	57,4 (1)	2,06 (5)	0,94	0,19	0,30	3,36
Guérande	6,65 (4)	0,457 (10)	94,8 (0)	57,5 (0)	1,31 (4)	0,37	0,13	0,08	31,52
Ilha do Sal	1,16 (13)	0,012 (77)	97,8 (0)	59,3 (0)	0,84 (0)	0,05	0,30	0,04	4,91
Espanha	1,45 (5)	0,028 (12)	99,0 (0)	60,1 (0)	0,55 (7)	0,01	0,13	0,02	-

* valores calculados em relação à massa seca do sal.

O sal marinho de Aveiro de 2004 é caracterizado, em termos médios, por possuir um teor de humidade de 7,09%, um resíduo insolúvel em água de 0,199% e um teor em cloreto de sódio e cloretos totais de 95,6% e 58,0%, respectivamente. O teor em sulfatos, sem contar com o sal da marinha Desgarrada, está presente em média num teor de 1,2%. Quanto à presença de Mg, Ca e K, estes representam, em média, 0,47%, 0,13% e 0,13% da massa seca do sal (Tabela 1.1). Com excepção do sal da marinha Desgarrada, onde não

foi detectado Al, para a maioria dos restantes sais este elemento está presente num teor de 4 a 6 µg/g, no sal das marinhas Senitra e Grã Caravela a quantidade é mais elevada (12 a 13 µg/g). Este valor está, no entanto, dentro dos valores admitidos para os produtos alimentares (ADI³ (Al): 10 a 15 mg). De acordo com estas características, o sal marinho de Aveiro apresenta as características necessárias para poder ser comercializado tal qual, como sal marinho artesanal [6].

Relativamente aos sais provenientes de outras origens (Tabela 1.2), aqueles que apresentam maiores quantidades de cloreto de sódio são o sal de mina de Espanha, como era de esperar, e o sal da Ilha do Sal. Este resultado reflecte-se em valores inferiores para os restantes parâmetros químicos. Os restantes sais provenientes de outras origens apresentam valores superiores a 94% de NaCl. Em relação ao Al e à matéria insolúvel, é o sal de Guérande que apresenta teores mais elevado. O sal de Tavira é o que apresenta um maior teor em sulfatos, Mg e K. Os sais da Ilha do Sal e de Espanha são aqueles em que o Mg e o K estão presentes em menor quantidade. As características físico-químicas de todos os sais de outras origens analisados estão dentro dos limites estabelecidos pela proposta de decreto-lei. Por comparação com o sal marinho de Aveiro verifica-se que, com excepção dos sais de Tavira e Guérande, o teor de humidade é inferior para os sais de outras origens. O mesmo se observa relativamente à percentagem de matéria insolúvel que só não é inferior à do sal de Aveiro, para o sal de Guérande. Quanto às percentagens de sulfatos e Mg, estas são superiores para o sal de Tavira. O Ca e o K encontram-se na mesma ordem de grandeza no sal de Aveiro e no sal das outras origens. O sal de Guérande apresenta um teor em alumínio mais elevado que os sais de Aveiro.

No que se refere às características organolépticas, não foi feita nenhuma avaliação rigorosa a estes sais, no entanto, neste trabalho procura-se explorar o conceito de odor característico do sal marinho referido na proposta de decreto-lei. Não são conhecidos estudos no que se refere a compostos orgânicos voláteis no sal. Por exemplo, apesar das salinas de Guérande serem alvo de protecção especial dada a qualidade do sal que produzem, as características químicas deste sal relacionadas com a sua composição em compostos orgânicos voláteis ainda não são conhecidas.

O sal marinho, sendo um produto natural que, ao contrário do sal refinado, não sofre qualquer transformação, poderá apresentar na sua constituição compostos orgânicos

³ Acceptable Daily Intake

voláteis provenientes da fauna e flora marinha e típica de ambientes hipersalinos assim como da envolvente ambiental das salinas. Existem algas e bactérias que vivem em ambientes hipersalinos [7, 8]. Estudos vários revelam a possibilidade de haver libertação de compostos voláteis derivados da degradação dos carotenóides por parte destes seres vivos [8, 9, 10, 11, 12, 13]. Os carotenóides são pigmentos responsáveis pela cor de muitas plantas, frutos e flores e fazem parte de uma classe de hidrocarbonetos biossintetizados a partir de 8 unidades isoprénicas. Estes pigmentos naturais, além de serem responsáveis por funções cruciais na fotossíntese, fotoprotecção e nutrição, são também considerados como sendo importantes precursores de aroma. Os norisoprenóides são compostos de aroma derivados dos carotenóides e ainda pouco se sabe sobre como são produzidos a nível biológico [11].

Para que os compostos voláteis possam ser identificados e quantificados, será necessário recorrer à sua extracção, separação e detecção. A microextracção em fase sólida e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (SPME-GC-MS) é uma metodologia que permite realizar este estudo.

1.2 MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (SPME-GC-MS)

1.2.1 MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA

A microextracção em fase sólida (SPME) surgiu da necessidade de se desenvolverem métodos analíticos simples, eficientes e acessíveis, para a monitorização e avaliação do meio ambiente, nomeadamente no que se relacionava com a análise de contaminantes orgânicos [14]. Foi introduzida no final dos anos 80 por Pawliszyn *et al.*, para a análise de poluentes em água [15]. A SPME apresentou-se como uma alternativa aos métodos de extracção em espaço de cabeça dinâmico, extracção líquido-líquido e outras técnicas de extracção [16]. Trata-se de uma técnica de extracção e pré-concentração simultânea de compostos voláteis e semi-voláteis, sem uso de solventes. Em SPME não ocorre uma extracção exaustiva, dado que o sistema tende para um equilíbrio em que os analitos se distribuem pelas diferentes fases do sistema [16]. Envolve uma fibra de sílica

fundida revestida com uma fina camada de uma fase estacionária (sólida, líquida ou mista) que é posta em contacto com a amostra (sistema de 2 fases) ou introduzida no seu “espaço de cabeça” (sistema de 3 fases) (HS-SPME) [14, 17]. Após a partição dos analitos entre fases, em que num sistema de 2 fases esta se dá entre a amostra e a fase estacionária da fibra e num sistema de 3 fases entre a amostra, o “espaço de cabeça” e a fase estacionária da fibra, os compostos sorvidos pela fase estacionária podem ser termicamente desorvidos no injector de um cromatógrafo de fase gasosa (GC), onde são separados.

Esta metodologia pode ser aplicada na análise da composição volátil de amostras sólidas, líquidas ou gasosas [18].

- Fases estacionárias da fibra de SPME

Existem vários tipos de fases estacionárias para SPME (Tabela 1.3). A escolha da fase estacionária mais adequada depende da composição volátil da amostra que se pretende analisar e das condições experimentais.

Tabela 1.3 – Exemplo de fases estacionárias disponíveis comercialmente para SPME; propriedades e aplicações (adaptado de [19])

Fase Estacionária	Espessura do filme (µm)	Temperatura máx. do injector do GC (°C)	Interacção	Aplicação
PDMS	100	280	Absorção	Compostos orgânicos apolares, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, benzeno/ tolueno/ etilbenzeno/ xileno, pesticidas organoclorados
	30	280		
	7	340		
PDMS/DVB	65	270	Mista	Hidrocarbonetos aromáticos, aminas aromáticas
	60	270		
CW/DVB	65	260	Mista	Compostos orgânicos polares tais como álcoois, cetonas, nitroaromáticos
CX/PDMS	75	320	Mista	Hidrocarbonetos
PA	85	320	Absorção	Compostos orgânicos polares tais como triazinas, pesticidas organofosforados e fenóis

PDMS: Polidimetilsiloxano; DVB: Divinilbenzeno; CW: Carbowax; CX: Carboxen; PA: Poliacrilato.

No que se refere à interacção entre a fase estacionária e os analitos extraídos da amostra, tal como se verifica na Tabela 1.3, esta pode ser de absorção, adsorção ou mista (Figura 1.4). Uma fase estacionária absorvente funciona como uma esponja, os analitos da

amostra são extraídos para o seu interior ficando solvatados pela fase estacionária [18]. Neste caso, a capacidade de absorver determinada quantidade de analito depende principalmente da espessura do filme e do tamanho do analito. Numa fase estacionária adsorvente os analitos são retidos à superfície de uma estrutura cristalina que pode apresentar micro (2-20 Å) , meso (20-500 Å) e macro poros (>500 Å). Neste tipo de fibras há um número mais limitado de locais de sorção do que nas absorventes, o que pode provocar competição entre os analitos [18]. Para concentrações de analito muito elevadas as fases estacionárias adsorventes ficam saturadas e a sua resposta deixa de ser linear [18]. A interacção com os analitos por absorção permite uma melhor linearidade na resposta, por sua vez a interacção por adsorção permite uma maior sensibilidade. Numa fase estacionária mista, como é o caso da CW/DVB, o efeito sinérgico de adsorção e absorção promove uma capacidade elevada de retenção dos analitos por parte da fase estacionária. Consequentemente uma fase estacionária mista torna-se mais sensível que uma absorvente [20].

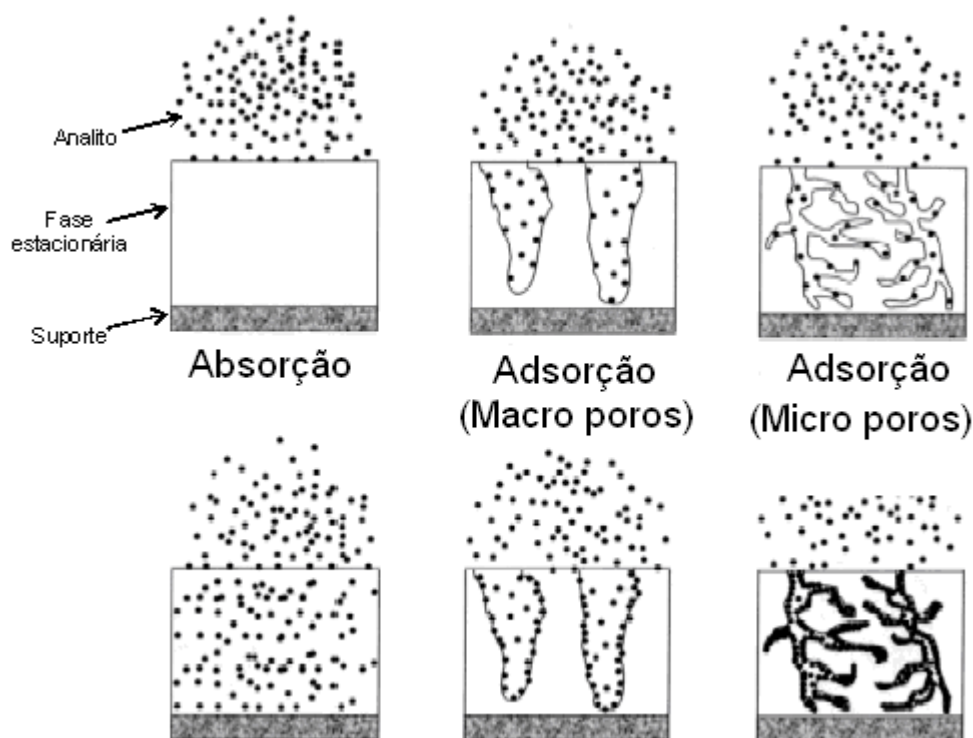


Figura 1.4 – Esquema representativo dos fenómenos de absorção e adsorção dos analitos pela fase estacionária da fibra de SPME (adaptado de [18])

Existem diferentes implementações para a exposição das fases estacionárias, usadas para microextração em fase sólida, às amostras a analisar. Um dos dispositivos mais usados, em que a fase estacionária se encontra protegida no interior de uma seringa, é aquele que se utiliza neste trabalho (Figura 1.5). Esta seringa apresenta um êmbolo que permite expor e recolher a fase estacionária da fibra de SPME quando esta se encontra em contacto com a amostra em estudo ou no injector de um cromatógrafo.

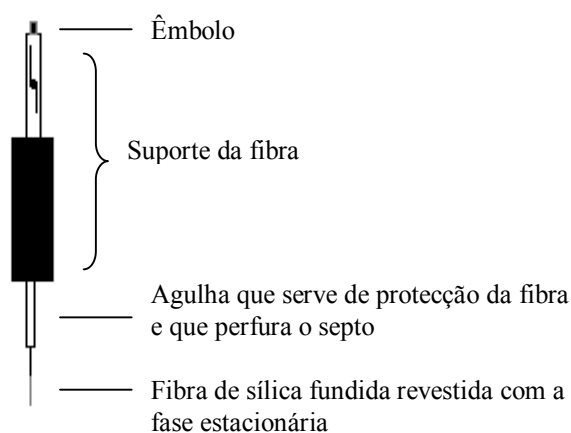


Figura 1.5 – Representação esquemática de uma seringa de SPME

- Influência das condições experimentais

A sensibilidade e reprodutibilidade da técnica de SPME dependem de parâmetros experimentais, tais como a temperatura de extração, o tempo de extração, o efeito “*salting out*”, a agitação, o volume e o modo de apresentação da amostra [17, 21].

O aumento da temperatura de extração pode promover a libertação de compostos para o espaço de cabeça da amostra, aumentando a sua volatilidade, como também a pode desfavorecer ao contribuir para o aumento da sua solubilidade, no caso da análise de amostras líquidas [21].

O tempo de exposição da fibra é escolhido consoante se queira trabalhar antes ou depois de se estabelecer o equilíbrio entre as fases do sistema. O equilíbrio de extração é alcançado quando a concentração do analito é homogênea e constante em cada uma das fases do sistema [14]. O tempo necessário para que se estabeleça o equilíbrio entre as fases

do sistema depende da composição da amostra. Estudos indicam que compostos menos voláteis necessitam de tempos de exposição da fibra mais longos [21]. Quanto maior o coeficiente de partição fase estacionária/ gás maior o tempo de equilíbrio [14]. Quando o equilíbrio não é atingido, a monitorização do tempo é essencial para a reprodutibilidade dos resultados [16].

O efeito “*salting out*” observa-se quando a presença de um sal em solução diminui a solubilidade dos compostos na fase aquosa, promovendo a sua passagem para a fase de vapor [22]. Recorre-se frequentemente ao efeito “*salting out*” para aumentar a sensibilidade de um método analítico, no entanto, com a adição de sal à solução amostra o tempo necessário para se estabelecer o equilíbrio aumenta, visto que há maior quantidade de analitos a migrar para a fibra [22]. Num sistema de 3 fases a presença de agitação torna o sistema dinâmico, contribuindo para uma fase aquosa mais homogénea e para a convecção no espaço de cabeça [14]. Na presença de agitação, o transporte de massa na solução aquosa é mais rápida, não sendo este um passo limitante no processo de difusão. Trabalhar em sistema dinâmico favorece a extracção de compostos semi-voláteis [14]. O limite de detecção de determinado composto também pode ser melhorado aplicando uma menor razão volume de espaço de cabeça/ volume de amostra (razão β), ou seja, aumentando o volume de amostra e diminuindo o volume de espaço de cabeça [14]. No que se refere ao modo de apresentação da amostra é comum a adição de água para libertar os analitos de uma matriz, o que contribui para um aumento da eficiência de extracção [19].

1.2.2 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC-MS)

Dado o poder de separação da cromatografia em fase gasosa e a capacidade de identificação da espectrometria de massa, uma combinação directa destas duas técnicas permite identificar componentes de misturas complexas [23].

Após a extracção da amostra, a fase estacionária da fibra de SPME sofre desorção térmica no injector de um cromatógrafo de fase gasosa (Figura 1.6-a), e com o auxílio de um gás de arraste (H_2 , N_2 , He, Ar) a amostra atravessa uma coluna revestida interiormente

com uma fase estacionária, onde os componentes da mistura são separados (Figura 1.6-b). A injeção pode dar-se em modo “split” em que só parte da amostra é direccionada para a cabeça da coluna ou em modo “splitless” em que toda a amostra injectada é direccionada para a cabeça da coluna do cromatógrafo, sendo apenas desprezados os solventes voláteis [23]. Este último modo de injeção é usado para análises vestigiais [23]. A separação dos componentes da mistura é determinada pela distribuição de cada componente entre o gás de arraste (fase móvel) e a fase estacionária. Um componente com pouca afinidade para a fase estacionária elui rapidamente [23]. Ao chegarem ao espectrómetro de massa do tipo quadrupolo as moléculas são ionizadas sob vácuo, formando-se um grupo de iões com diferentes razões massa/ carga (m/z) que são separados pela interacção de campos eléctricos e posteriormente detectados (Figura 1.6-c).

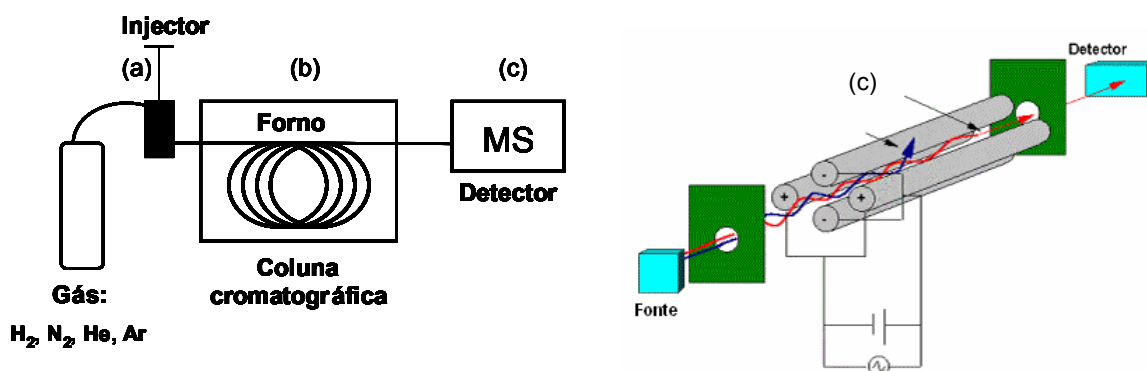


Figura 1.6 – Esquema de um equipamento de GC-MS. (a) Volatilização da amostra; (b) Separação dos componentes da amostra; (c) Identificação de cada componente.

(http://www.mcb.mcgill.ca/~hallett/GEP/PLecture1/MassSpe_files/image011.gif)

O espectrómetro de massa do tipo quadrupolo mede a razão m/z de iões em fase gasosa e a sua abundância. É possível controlar os iões que atingem o detector pela variação do campo eléctrico do sistema envolvido neste tipo de detector [23].

Cada composto apresenta uma fragmentação característica que, para um mesmo tipo de detector, só é dependente da energia dos electrões ionizantes e da temperatura a que ocorre a ionização [23]. Dos cromatogramas que se obtêm é possível retirar informação

qualitativa, que está relacionada com o tempo de retenção característico de cada componente e informação quantitativa, referente às áreas cromatográficas dos picos [23]. A cada ponto do cromatograma está associado um espectro de massa. Neste é estabelecida a relação entre a razão m/z dos iões detectados e a abundância de cada espécie iónica. A intensidade relativa (abundância) dos iões observados no espectro de massa de um composto puro pode variar de instrumento para instrumento. Instrumentos devidamente calibrados apresentarão todos os mesmos iões aos mesmos valores de m/z [23].

2. OBJETIVOS

Como foi referido no capítulo da introdução é possível extrair da natureza o sal-gema e o sal marinho, sendo o sal marinho o objecto de estudo deste trabalho. Este sal, para além do cloreto de sódio, apresenta na sua composição outros sais assim como oligoelementos. Com o fim de valorizar o produto sal marinho, tornando-o um produto mais conhecido no que se refere às suas características químicas, realizou-se este trabalho cujo principal objectivo foi o desenvolvimento e implementação de uma metodologia para análise dos compostos voláteis do sal marinho por microextracção em fase sólida associada à cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (SPME-GC-MS). Esta metodologia foi utilizada para:

- a caracterização da composição volátil de sal marinho proveniente de Aveiro (diferentes marinhas), Castro Marim, Tavira, Guérande, Ilha do Sal e de sal de mina proveniente de Espanha.
- A identificação de potenciais marcadores de origem.
- a quantificação do composto β -ionona nos sais analisados.

Foi também realizada uma caracterização físico-química sumária dos sais em estudo que incluiu a determinação das percentagens de humidade, matéria insolúvel, cloretos de sódio, cloretos totais, magnésio, cálcio e potássio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE SAL USADAS NESTE ESTUDO

Na fase de desenvolvimento da metodologia de SPME-GC-MS, foram usadas amostras de sal marinho de Aveiro provenientes das marinhas “Grã Caravela” e “Peijota”. A metodologia desenvolvida foi posteriormente aplicada a amostras de sal marinho provenientes de Aveiro, Castro Marim, Tavira (flor de sal), Guérande (França) e Ilha do Sal (Cabo Verde) e a uma amostra de sal de mina proveniente de Espanha. Como branco da amostra (referência) foi utilizado NaCl p.a. (99,5%, Sigma).

Em relação ao sal marinho de Aveiro foram analisadas amostras de todas as marinhas activas em 2005, “18 Carmonetes” no grupo Norte, “Passã”, “Podre” e “Caniceira” no grupo de S. Roque ou Esgueira, “Senitra”, “Peijota”, “Grã Caravela”, “Troncalhada” e “Santiago da Fonte” no grupo Sul, e de duas marinhas activas em 2004, “Desgarrada” no grupo Norte e “Passã” no grupo de São Roque ou Esgueira (Figura 1.1).

Todas as amostras de sal em estudo foram obtidas no âmbito do projecto SAL “Sal do Atlântico”. As amostras fornecidas, recolhidas e transportadas em sacos de plástico, foram armazenadas em frascos de vidro até serem analisadas.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS QUANTO À PERCENTAGEM DE HUMIDADE, MATÉRIA INSOLÚVEL, CLORETO DE SÓDIO, CLORETOS TOTAIS, MAGNÉSIO, CÁLCIO E POTÁSSIO

A caracterização das amostras quanto à percentagem de humidade, matéria insolúvel, cloreto de sódio, cloretos totais, magnésio, cálcio e potássio foi realizada para as amostras de sal de Aveiro de 2005.

3.2.1 DETERMINAÇÃO DA PERCENTAGEM DE HUMIDADE

A percentagem de humidade das amostras de sal em estudo foi determinada pelo método de estufa. Pesaram-se rigorosamente, numa balança analítica, cerca de 5 g de amostra de sal em folha de alumínio que logo de seguida foi colocada a secar numa estufa a 110°C, durante cerca de 12 h. Após um período de arrefecimento as amostras foram de

novo pesadas na mesma balança analítica. Este procedimento repetiu-se até que as amostras apresentassem um peso constante após a secagem [24, 25]. Foram realizados 3 ensaios. Finalmente calculou-se o teor de humidade das amostras pela fórmula:

$$\%Humidade = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

m_1 – massa da amostra antes de seca
 m_2 – massa da amostra depois de seca

3.2.2 DETERMINAÇÃO DA PERCENTAGEM DE MATÉRIA INSOLÚVEL

Para a determinação do teor em matéria insolúvel pesou-se rigorosamente, numa balança analítica, cerca de 50 g de amostra de sal e dissolveu-se a quente num copo de precipitação com 250 mL de água destilada. Entretanto, o papel de filtro a usar na filtração foi seco numa estufa a 101°C e após arrefecimento num exsiccador contendo sílica, foi pesado numa balança analítica. Depois do sal totalmente dissolvido, deixou-se arrefecer a solução e prosseguiu-se com uma filtração por sucção. O resíduo insolúvel depositado no papel de filtro foi seco numa estufa a 101°C e, após arrefecimento num exsiccador contendo sílica, foi pesado na balança analítica [25]. Foram realizados 3 ensaios. O teor em matéria insolúvel foi calculado pela fórmula:

$$\% \text{ matéria insolúvel} = \frac{m_1 - m_2}{m_{\text{pesada}} (\text{sal marinho seco})} \times 100$$

m_1 – massa do papel de filtro + resíduo de matéria insolúvel

m_2 – massa do papel de filtro

3.2.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CLORETO DE SÓDIO E CLORETOS TOTAIS

O teor em cloreto de sódio e cloretos das amostras de sal foi determinado pelo método de Charpentier Volhard. Em primeiro lugar preparou-se uma solução da amostra a

analisar, em que num balão de 500 mL se dissolveram 3 g de amostra de sal em água destilada. De seguida, para um balão volumétrico de 250 mL, mediram-se 25 mL da solução-amostra, 5 mL de HNO₃ concentrado (65%, Fluka), adicionaram-se 50 mL de uma solução de AgNO₃ (Panreac) 0,1 M e fez-se o volume de 250 mL com água destilada. O precipitado branco de cloreto de prata que se formou foi filtrado por gravidade com auxílio de um filtro de pregas. Para titular o excesso de ião prata presente em solução, mediu-se uma alíquota de 25 mL do filtrado para um erlenmeyer, adicionou-se como indicador 1,5 mL de uma solução de 40% em FeNH₄(SO₄)₂·12H₂O (99%, Sigma) e titulou-se com uma solução padrão 0,020 M de KSCN (p.a., Merck), até ao aparecimento de uma cor persistente vermelha-acastanhada em solução [26]. Foram realizados 3 ensaios.

O teor em cloreto foi calculado a partir das fórmulas:

$$m_1 = \text{concentração da solução de AgNO}_3 \text{ (mmol/mL)} \times V_{\text{adicionado}}(\text{solução de AgNO}_3)(\text{mL})$$

$$m_2 = V_{\text{gasto}}(\text{solução de KSCN})(\text{mL}) \times \text{concentração da solução de KSCN (mmol/mL)} \times f_1$$

$$f_1 = 10$$

$$m_3 = m_1 - m_2$$

$$\% \text{ NaCl} = \frac{m_3 \times f_2 \times M_r(\text{NaCl})}{m_{\text{pesada}}(\text{sal marinho seco})} \times 100$$

$$\% \text{ Cl}^- = \frac{m_3 \times f_2 \times M_r(\text{Cl})}{m_{\text{pesada}}(\text{sal marinho seco})} \times 100$$

$$M_r(\text{NaCl}) = 58,44 \text{ g/mol} \quad f_2 = 20$$

$$M_r(\text{Cl}) = 35,45 \text{ g/mol}$$

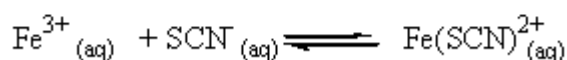
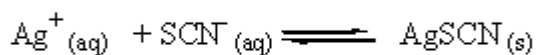
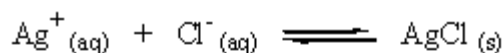
m_1 – n° de moles de Ag⁺ adicionadas inicialmente à solução de sal marinho

m_2 – n° de moles de Ag⁺ que não reagiram (em excesso)

m_3 – n° de moles de Ag⁺ que reagiram com Cl⁻

f_1 e f_2 – factores de diluição

- REACÇÕES ENVOLVIDAS



3.2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR EM MAGNÉSIO, CÁLCIO E POTÁSSIO

O teor em Mg, Ca e K nas amostras de sal foi determinado por espectroscopia de emissão por plasma (ICP). Os limites de detecção do método de ICP para este estudo são de 0,54 mg/L para o magnésio, 0,59 mg/L para o cálcio e 0,24 mg/L para o potássio. Para cada amostra de sal a analisar foram preparadas duas soluções com concentração de 5% (m/v), em que num balão volumétrico de 100 mL foram colocadas 5 g de amostra, 1 mL de ácido clorídrico concentrado (37%, Riedel-de Haën) e o volume foi perfeito com água ultra-pura, após dissolução do sal. Os balões volumétricos onde se prepararam as soluções assim como todo o material utilizado na sua preparação, foram lavados com ácido nítrico concentrado, enxaguados com água destilada e, por fim, com água ultra-pura⁴.

A análise por ICP foi realizada pela equipa técnica do Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro.

⁴ Água bidestilada que é filtrada num filtro de carvão activado, de seguida num filtro de iões e que ainda sofre uma ultrafiltração (0,01µm).

3.3 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE SPME-GC-MS PARA A ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DO SAL MARINHO

A fase estacionária da fibra de SPME (CW/DVB), a coluna cromatográfica (DB-FFAP), o tempo de exposição da fibra (90 min) e o tempo de desorção no injetor do GC-MS (15 min) foram parâmetros estabelecidos desde o início e que se mantiveram ao longo de todo o trabalho.

As condições experimentais usadas em cada ensaio referente ao desenvolvimento da metodologia de SPME-GC-MS para a análise da composição volátil do sal marinho encontram-se sumariadas na Tabela 3.1.

3.3.1 CARBOWAX-DIVINILBENZENO (CW/DVB)

Ao longo de todo o trabalho usou-se como fase estacionária da fibra de SPME a carbowax-divinilbenzeno (CW/DVB) com 65 µm de espessura produzida pela Supelco (Aldrich, Bellefonte, PA). De acordo com as recomendações do produtor a CW/DVB é indicada para a análise de alcoóis e compostos polares (MW 40-275). Na interação com os analitos esta fase estacionária caracteriza-se como sendo mista, combinando as propriedades de absorção do polímero líquido (Carbowax) com as propriedades de adsorção das partículas porosas (Divinilbenzeno) [27]. Esta fase estacionária, constituída por micro (2-20 Å), meso (20-500 Å) e macro poros (>500 Å), com capacidade de sorver compostos numa grande amplitude de características físico-químicas, foi considerada a mais indicada para este trabalho pelo facto de não existirem estudos referenciados na literatura sobre a composição volátil do sal. A fase estacionária da fibra de SPME foi acondicionada no injetor do GC, à temperatura de 250°C e por um período de 60 min. O factor de resposta da fibra de SPME foi controlado pela análise periódica de uma solução padrão de 3-octanol (23,1g/L).

3.3.2 ENSAIOS PRELIMINARES

- **Análise da composição volátil do sal sólido** (Ensaio 1)

Para a análise preliminar da composição volátil do sal sólido foram utilizadas amostras de sal marinho de Aveiro de 2004 da marinha Grã Caravela. Pesou-se rigorosamente numa balança analítica cerca de 35 g (40 mL) da amostra de sal sólido que foi introduzida num frasco de 120 mL (razão $1/\beta = 0,5$) (Tabela 3.1). O frasco foi encapsulado, colocado num banho termostaticado a 40°C e a fase estacionária da fibra de SPME foi exposta à fase de vapor da amostra durante 90 min. Após este período a fibra foi recolhida e injectada no GC-MS, tendo permanecido no injector durante 15 min para completa desorção dos compostos e consequente limpeza da fibra.

- **Análise da composição volátil do sal em solução aquosa** (Ensaio 2-4)

Utilizando o sal da marinha Pejota de 2004, foi feita a análise dos compostos voláteis libertados quando o sal foi dissolvido em água (Tabela 3.1). Para tal, pesou-se rigorosamente numa balança analítica cerca de 25 g da amostra de sal sólido que foi colocada num frasco de 120 mL contendo um agitador de 30 mm de comprimento e à qual se adicionou água destilada até se atingir um volume de 40 mL (razão $1/\beta = 0,5$). O frasco foi encapsulado e colocado num banho termostaticado a 40°C sob agitação constante (500 r.p.m.). Após um período de 2 h de tempo de espaço de cabeça a fase estacionária da fibra de SPME foi exposta à fase de vapor da amostra durante 90 min. Após este período a fibra foi recolhida e injectada no GC-MS, tal como descrito no Ensaio 1.

A análise descrita no ensaio 2 foi repetida para períodos de 4 h (Ensaio 3) e 18 h (Ensaio 4) de tempo de espaço de cabeça.

Define-se como tempo de espaço de cabeça o período de tempo em que a amostra se encontra fechada no interior do frasco de análise até ao momento em que a fibra é exposta ao espaço de cabeça.

3.3.3 OPTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA

Os parâmetros otimizados na aplicação da metodologia de SPME-GC-MS à análise da composição volátil de sal foram, i) a quantidade de amostra, ii) a temperatura de extracção, iii) o modo de apresentação da amostra (sólido ou em solução aquosa) e iv) elaboração do branco da amostra (referência).

i) QUANTIDADE DE AMOSTRA EM SOLUÇÃO e ii) TEMPERATURA DE EXTRACÇÃO (Ensaio 5-10)

Foram analisadas soluções aquosas saturadas com 16 e 25 g de amostra de sal da marinha Peijota às temperaturas de 40, 50 e 60°C (Tabela 3.1).

Num frasco de 120 mL contendo um agitador de 30 mm de comprimento introduziram-se 16 g de amostra de sal e adicionou-se água ultra-pura até se atingir um volume de 40 mL (razão $1/\beta = 0,5$). O frasco foi colocado num banho termostaticado a 40°C, sob agitação constante (500 r.p.m.). Após um período de 18 h de tempo de espaço de cabeça a fase estacionária da fibra de SPME foi exposta à fase de vapor da amostra durante 90 min. Após este período a fibra foi recolhida e injectada no GC-MS, tal como descrito no Ensaio 1.

Esta análise foi repetida à temperatura de 50 e 60°C do banho termostaticado e usando 25 g de amostra.

iii) MODO DE APRESENTAÇÃO DA AMOSTRA (Ensaio 11 e 12)

Não havendo nenhum ensaio com sal sólido exactamente às mesmas condições de um ensaio com solução aquosa saturada de sal decidiu-se analisar, para uma comparação de resultados mais rigorosa, a composição volátil de uma amostra de sal da marinha Peijota do ano de 2005 no seu estado sólido e em solução aquosa pela seguinte metodologia: Para a análise ao sal sólido pesou-se rigorosamente, numa balança analítica, cerca de 35 g (40 mL) da amostra de sal sólido e introduziu-se a mesma num frasco de 120 mL (razão $1/\beta = 0,5$) (Ensaio 11, Tabela 3.1). Para a amostra de sal em solução aquosa introduziram-se 16 g de amostra de sal num frasco de 120 mL contendo um agitador de 30 mm de

comprimento e adicionou-se água ultra-pura até se atingir um volume de 40 mL (razão $1/\beta = 0,5$) (Ensaio 12). Os frascos foram encapsulados e colocados num banho termostatzado a 60°C. Após um período de 18 h de tempo de espaço de cabeça a fase estacionária da fibra de SPME foi exposta à fase de vapor das amostras durante 90 min. Após este período a fibra foi recolhida e injectada no GC-MS, tal como descrito no Ensaio 1.

iv) Elaboração do branco da amostra (referência) (Ensaio 13)

Analisou-se às mesmas condições do ensaio 12, uma solução aquosa saturada de NaCl p.a. (Tabela 3.1). Num frasco de 120 mL contendo um agitador de 30 mm de comprimento introduziram-se 16 g de sal p.a. e adicionou-se água ultra-pura até se atingir um volume de 40 mL (razão $1/\beta = 0,5$). O frasco foi colocado num banho termostatzado a 60°C, sob agitação constante (500 r.p.m.). Após um período de 18 h de tempo de espaço de cabeça a fase estacionária da fibra de SPME foi exposta à fase de vapor da amostra durante 90 min. Após este período a fibra foi recolhida e injectada no GC-MS, tal como descrito no Ensaio 1.

Tabela 3.1 – Tabela resumo das condições experimentais usadas em cada ensaio referente ao desenvolvimento da metodologia de SPME-GC-MS para a análise da composição volátil de sal.

	Nº Ensaio	Modo de apresentação da amostra de sal	Origem	Massa de sal (g)	Volume frasco (mL)	Volume amostra (mL)	Tipo de água	T (°C)	Tempo espaço de cabeça (h)	Tempo de exposição da fibra (min)	Nº de réplicas
Ensaios preliminares	1	sólido	Grã Caravela	35	120	40	-	40	0	90	1
	2	solução aquosa	Peijota 2004	25	120	40	destilada	40	2	90	1
	3	solução aquosa	Peijota 2004	25	120	40	destilada	40	4	90	1
	4	solução aquosa	Peijota 2004	25	120	40	destilada	40	18	90	2
Optimização da metodologia	5	solução aquosa	Peijota 2004	16	120	40	ultra-pura	40	18	90	3
	6	solução aquosa	Peijota 2004	16	120	40	ultra-pura	50	18	90	3
	7	solução aquosa	Peijota 2004	16	120	40	ultra-pura	60	18	90	3
	8	solução aquosa	Peijota 2004	25	120	40	ultra-pura	40	18	90	3
	9	solução aquosa	Peijota 2004	25	120	40	ultra-pura	50	18	90	3
	10	solução aquosa	Peijota 2004	25	120	40	ultra-pura	60	18	90	3
	11	sólido	Peijota 2005	35	120	40	-	60	18	90	3
	12	solução aquosa	Peijota 2005	16	120	40	ultra-pura	60	18	90	3
	13	solução aquosa	p.a. (99,5% NaCl)	16	120	40	ultra-pura	60	18	90	3

3.3.4 METODOLOGIA DE SPME-GC-MS DESENVOLVIDA PARA A ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DE SAL MARINHO

Num frasco de 120 mL contendo um agitador de 30 mm de comprimento são introduzidos 16 g de sal e adiciona-se água ultra-pura até se atingir um volume de 40 mL. O frasco é colocado num banho termostatzado a 60°C, sob agitação constante (500 r.p.m.) (Figura 3.1–a). Após um período de 18 h de tempo de espaço de cabeça a fase estacionária da fibra de SPME é exposta à fase de vapor da amostra durante 90 min (Figura 3.1–b). Após este período a fibra é recolhida e injectada no GC-MS, permanecendo no injectador durante 15 min para completa desorção dos compostos e consequente limpeza da fibra (Figura 3.1–c). Os compostos desorvidos são separados por cromatografia em fase gasosa e posteriormente identificados por espectrometria de massa. Devem ser realizadas, pelo menos, 3 réplicas para cada amostra de sal.

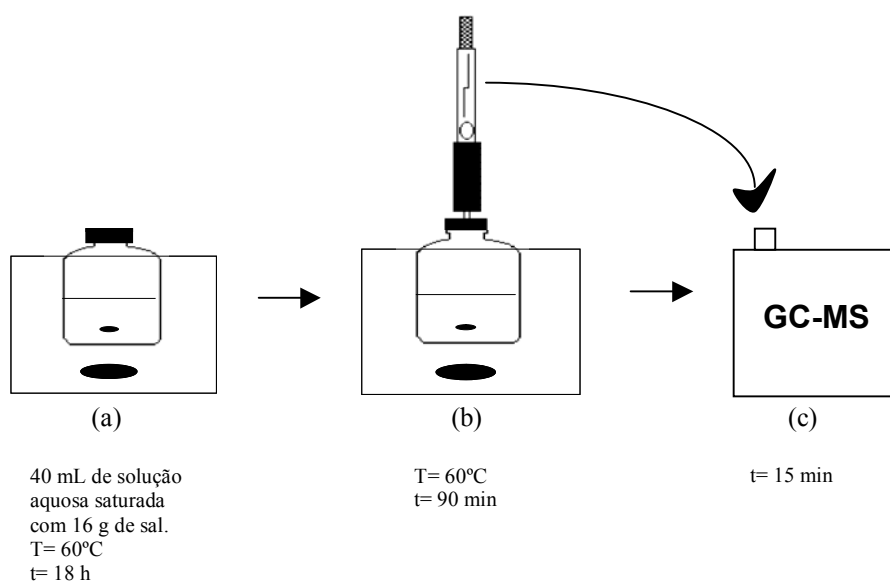


Figura 3.1 – Esquema da metodologia desenvolvida para a análise da composição volátil do sal.

- (a) Formação do espaço de cabeça. (b) Exposição da fase estacionária da fibra de SPME ao espaço de cabeça da amostra. (c) Separação e identificação dos compostos extraídos por SPME.

3.3.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC-MS)

As amostras extraídas por SPME foram analisadas num cromatógrafo de fase gasosa Agilent 6890 N acoplado a um espectrómetro de massa Agilent 5973 N do tipo quadrupolo, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-FFAP com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme (J & W Scientific). A injeção deu-se em modo *splitless* (5 min) e o gás de arraste utilizado foi o hélio (fluxo de 1,7 mL/min) que permitiu que a pressão à cabeça da coluna fosse de 12 psi. O injector e a linha de transferência encontravam-se à temperatura de 250°C.

Para os Ensaios 1 a 4, o forno encontrava-se inicialmente a 35°C, sendo aquecido até aos 220°C a um gradiente de 2°C/min, e mantendo-se nesta temperatura durante 10 min. Para os Ensaios 3 a 13 e análise das amostras de sal das diferentes origens, o forno foi programado para uma temperatura inicial de 35°C, mantendo-se nesta durante 2 min, seguida de uma primeira rampa de aquecimento até 100°C a um gradiente de 4°C/min e de uma segunda rampa de aquecimento até 200°C à velocidade de 2°C/min, mantendo-se nesta 5 min.

O espectrómetro de massa trabalhou em modo de impacto electrónico (EI) a 70 eV, com a temperatura da fonte a 230°C e a temperatura do quadrupolo a 150°C. A análise em modo de varrimento foi feita no intervalo de 33-300 m/z a 3 ciclos/s.

3.3.6 TRATAMENTO DE DADOS

A identificação dos picos dos cromatogramas dos diferentes sais analisados foi feita pela base de dados Wiley 275 disponível no software do GC-MS. Dos compostos orgânicos voláteis identificados no sal foi possível confirmar o tempo de retenção de alguns destes a partir da análise dos padrões puros correspondentes. Os padrões utilizados foram os seguintes: 1,8-Cineol (99%, Aldrich), 3-Octanol (99%, Aldrich), 3-Octanona (99%, Aldrich), β-Ionona (97%, Fluka), Geranil acetona (98%, Fluka), Hexanoato de etilo (99%, Aldrich), Octanoato de etilo (99%, Aldrich), Decanoato de etilo (99%, Aldrich),

BHT (99%, Aldrich), *p*-Cimeno (99,5%, Fluka), α -Humuleno (98%, Fluka) e 1,2,4-Trimetilbenzeno (98%, Aldrich).

Foi feita uma análise por componentes principais (PCA) dos cromatogramas (tempo de retenção *versus* abundância) das diferentes amostras de sal analisadas (16 amostras \times 3 ensaios cada) pela metodologia desenvolvida neste estudo, usando o software CATS (Universidade de Aveiro). Foi necessário um pré-tratamento dos dados para corrigir as diferenças observadas nos perfis cromatográficos. Para uma sobreposição mais correcta dos cromatogramas de todas as amostras de sal marinho analisadas recorreu-se a um programa de ajuste automático (Dynamic Time Warping (DTW) – Correlation Optimized Warping (COW)). Esta análise quimiométrica aos resultados experimentais foi realizada pelo Doutor António Barros, Investigador do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Para efeito de comparação da composição volátil das amostras de sal analisadas, fez-se uma estimativa da sua composição com base nas áreas cromatográficas dos compostos identificados obtidas após integração dos cromatogramas.

O tratamento estatístico na análise e comparação dos resultados foi feita por aplicação do teste de *t* de Student ($p \leq 0,05$).

3.3.7 QUANTIFICAÇÃO DA β -IONONA NOS SAIS

A partir de uma solução-mãe de 458 mg/L de β -ionona, preparada a partir do padrão puro (Fluka, 97%), preparou-se uma solução de 458 μ g/L. A partir desta foram preparadas em balões de 250 mL soluções aquosas de concentração 16, 81, 244, 406 e 568 ng/L em β -ionona. Cada uma das soluções padrão foi analisada pela metodologia desenvolvida para a análise da composição volátil do sal marinho. O sal usado nesta análise foi o NaCl p.a. (99,5%).

O espectro de massa da β -ionona apresenta como fragmento mais intenso o ião correspondente ao pico 177 (m/z). Após a análise das soluções padrão prosseguiu-se com o tratamento dos seus cromatogramas por extracção do ião 177 (m/z) e integração do pico correspondente. O mesmo tratamento foi realizado para os cromatogramas das amostras.

Foi traçada uma curva de calibração para a β -ionona (área cromatográfica *versus* concentração de β -ionona em ng/L). A partir da equação da curva de calibração externa foi possível quantificar a β -ionona nas amostras de sal marinho em que este composto foi identificado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS QUANTO À PERCENTAGEM DE HUMIDADE, MATÉRIA INSOLÚVEL, CLORETO DE SÓDIO, CLORETOS TOTAIS, MAGNÉSIO, CÁLCIO E POTÁSSIO

O sal marinho de Aveiro de 2005 foi caracterizado quanto à percentagem de humidade, matéria insolúvel, cloretos, magnésio, cálcio e potássio (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Percentagens de humidade, matéria insolúvel, cloretos, magnésio, cálcio e potássio no sal marinho de Aveiro de 2005.

Sal marinho de Aveiro (2005)	MARINHAS	% Humidade (CV)	% Mat. Insolúvel* (CV)	% NaCl* (CV)	% Cl ⁻ * (CV)	% Mg*	% Ca*	% K*
	18 Carmonetes	9,31 (1)	0,160 (8)	93,9 (0)	56,9 (0)	1,03	0,10	0,28
	Passã	6,50 (2)	0,259 (34)	96,2 (0)	58,4 (0)	0,68	0,12	0,19
	Podre	12,76 (3)	0,338 (40)	91,9 (0)	55,7 (0)	1,32	0,11	0,30
	Caniceira	8,77 (3)	0,063 (41)	94,7 (0)	57,5 (0)	0,60	0,60	0,14
	Troncalhada	9,32 (1)	0,108 (7)	91,8 (0)	55,7 (0)	1,42	0,11	0,26
	Senitra	5,34 (3)	0,448 (2)	97,0 (1)	58,8 (1)	0,40	0,30	0,09
	Peijota	7,48 (3)	0,055 (9)	95,1 (0)	57,7 (0)	1,00	0,13	0,21
	Grã Caravela	7,48 (1)	0,460 (4)	93,0 (1)	56,4 (1)	0,86	0,16	0,21
	Santiago da Fonte	9,57 (1)	0,132 (12)	92,9 (0)	56,3 (0)	1,12	0,12	0,25

* valores calculados em relação à massa seca do sal.

Comparando estes resultados com os obtidos para o sal marinho de Aveiro de 2004, apresentados no capítulo da ‘Introdução’ (Tabela 1.1), verifica-se que existem diferenças. O teor de cloreto de sódio e cloretos totais é inferior nas amostras de 2005 para os sais das marinhas 18 Carmonetes, Troncalhada, Peijota, Grã Caravela e Santiago da Fonte e superior para o sal da marinha Senitra. O sal da marinha Passã é o único que apresenta um teor em cloreto de sódio e cloretos totais igual em 2004 e 2005. A percentagem de humidade mantém-se igual apenas para o sal da marinha 18 Carmonetes, para os sais das restantes marinhas a humidade é superior nas amostras de 2005 com excepção apenas do sal da marinha Senitra cuja humidade da amostra de 2005 é inferior. O sal da marinha Podre, produzido apenas em 2005, é o que apresenta um maior teor de água (12,76%). Relativamente à percentagem de matéria insolúvel em água, verifica-se não haver diferenças entre as amostras de sal de 2004 e de 2005 para os sais das marinhas Peijota, Passã e Santiago da Fonte. Observaram-se teores de matéria insolúvel superiores em 2004 para os sais das marinhas Troncalhada e Senitra e em 2005 para os sais das marinhas 18

Carmonetes e Grã Caravela. O teor em Mg e K é superior para o sal de Aveiro de 2005, com excepção apenas do sal da marinha Senitra. O teor em cálcio diminui para o sal da marinha Passã e aumenta para os sais das marinhas Senitra e Peijota.

De acordo com a proposta de decreto-lei de 20 de Outubro de 2005 que define e caracteriza o ‘Sal Marinho Tal Qual’, o sal de Aveiro de 2005 das diferentes marinhas apresenta um teor de água superior ao limite máximo estabelecido (6%), com excepção do sal da marinha Senitra. Este facto pode ser resultado do sal cedido para análise não estar devidamente escorrido. Relativamente ao teor em cloreto de sódio, os sais das marinhas Podre, Troncalhada, Grã Caravela e Santiago da Fonte apresentam um teor inferior ao limite mínimo estabelecido (94%, em relação à massa seca). Estas percentagens são demasiado baixas e, como não são explicadas pelos resultados obtidos para os restantes parâmetros químicos, poderá ter ocorrido um erro experimental que não foi detectado.

Tendo sido analisadas amostras de sal marinho de Aveiro de 10 marinhas diferentes e de 2 anos consecutivos, pode observar-se que o sal marinho de Aveiro apresenta um teor de cloreto de sódio entre 91,8% e 97,0%, um teor em cloretos totais entre 55,7% e 58,8%, um teor de humidade entre 5,34% e 12,76%, um teor em Mg entre 0,23% e 1,42%, um teor em Ca entre 0,09% e 0,60% e finalmente um teor em K entre 0,08% e 0,30%.

4.2 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE SPME-GC-MS PARA A ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DO SAL MARINHO

Visto não existirem estudos sobre a análise da composição volátil de sal foi necessário definir, tendo em conta o tempo estabelecido para a realização do trabalho, os parâmetros a otimizar para a aplicação da metodologia de SPME-GC-MS. Após a realização de alguns ensaios preliminares, prosseguiu-se com a optimização dos parâmetros: i) quantidade de amostra, ii) temperatura de extracção, iii) modo de apresentação da amostra (sal sólido ou em solução aquosa) e iv) elaboração do branco da amostra (referência).

4.2.1 ENSAIOS PRELIMINARES

Este estudo foi iniciado utilizando amostras de sal marinho de Aveiro de 2004, da marinha Grã Caravela. O sal foi analisado no estado sólido, num frasco de 120 mL, à temperatura de 40°C (Ensaio 1). O cromatograma resultante deste ensaio está representado na Figura 4.1. Como se pode observar, o cromatograma apresenta poucos picos, só se detecta uma pequena fracção mais volátil.

De acordo com a bibliografia [19], a adição de água a uma matriz pode facilitar a libertação de compostos a partir desta, o que aumenta a eficiência de extracção da fracção volátil. Desta forma optou-se por analisar uma solução aquosa de sal marinho testando diferentes tempos de espaço de cabeça (2 h, 4 h e 18 h) (Figura 4.2). Nestes ensaios optou-se por usar sal da marinha Peijota por apresentar um odor mais intenso.

Observando os cromatogramas da Figura 4.2, em que são analisadas soluções aquosas saturadas de sal, e comparando com o cromatograma da análise ao sal sólido (Figura 4.1), ressaltando o facto do sal não ser da mesma marinha, verifica-se que a hidratação e dissolução do sal permite a libertação de um maior número de compostos orgânicos voláteis presentes no sal. Os cromatogramas apresentam um maior número de picos e áreas cromatográficas superiores. A hidratação e dissolução do sal deverá permitir que compostos que estejam retidos nos cristais de sal passem para a fase aquosa e posteriormente para a fase de vapor, por efeito de “*salting out*”.

Tendo em conta os resultados obtidos, a optimização da metodologia em termos de quantidade de amostra e temperatura de extracção foi realizada para amostras de sal em solução aquosa.

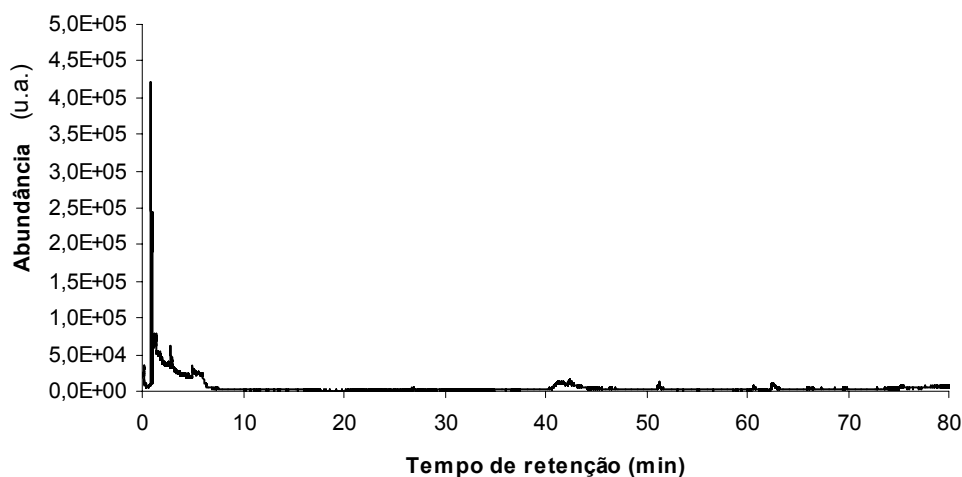


Figura 4.1 – Cromatograma da análise ao sal da marinha Grã Caravela no seu estado sólido
(u.a) – unidades arbitrárias

A comparação dos cromatogramas correspondentes à análise das amostras a diferentes tempos de espaço de cabeça indica que a análise a 18 h permitiu a obtenção de um cromatograma com um maior número de picos relativamente aos ensaios em que o tempo de espaço de cabeça foi inferior (2 h e 4 h). Em consequência desta observação, estabeleceu-se que este seria o tempo de espaço de cabeça adequado à análise da composição volátil do sal. Embora seja um período de tempo elevado, este é mais exequível, permitindo que a formação do espaço de cabeça da amostra se faça de um dia para o outro.

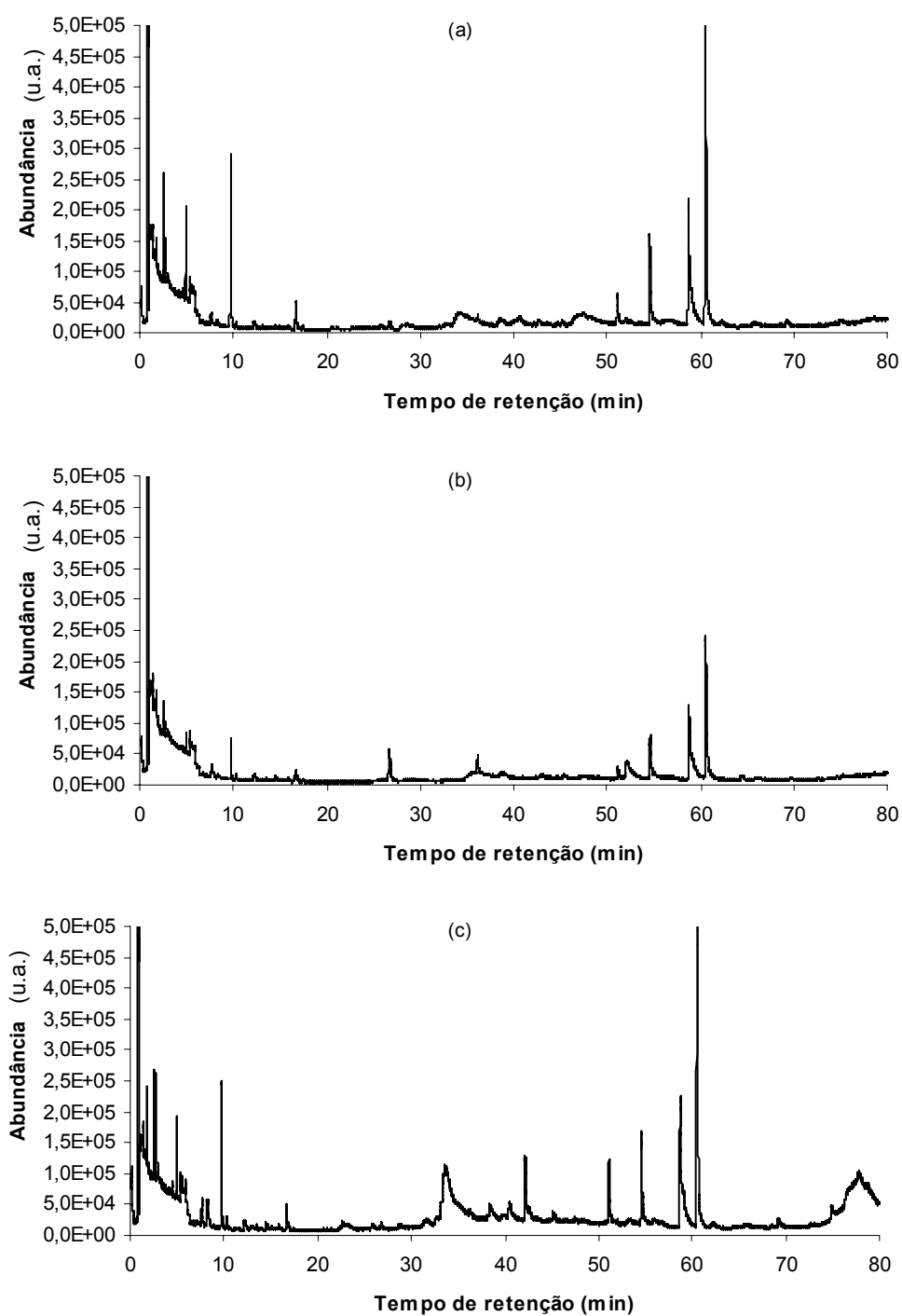


Figura 4.2 – (a) Cromatogramas da solução aquosa saturada de sal, a 40°C e aplicando um tempo de espaço de cabeça de 2 h, (b) 4 h e (c) 18 h.
(u.a.) – unidades arbitrárias

4.2.2 OPTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE SPME-GC-MS PARA A ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DO SAL MARINHO

➤ TEMPERATURA DE EXTRACÇÃO E QUANTIDADE DE AMOSTRA

O efeito da temperatura na extracção dos compostos orgânicos voláteis do sal foi estudado aplicando diferentes temperaturas (constantes) ao período que compreende o tempo de espaço de cabeça (18h) e o tempo de exposição da fibra (90 min). Decidiu-se também que esta temperatura não deveria ultrapassar os 60°C para não se correr o risco de promover degradação de componentes da amostra, nomeadamente da fracção orgânica. Pretendeu-se simultaneamente otimizar a quantidade de amostra a usar na solução aquosa saturada de sal. Com este objectivo, foram analisadas soluções aquosas saturadas com 16 e 25 g de sal da marinha Peijota de 2004 às temperaturas de 40, 50 e 60°C (Ensaio 5-10). Os resultados destas análises encontram-se na Tabela 4.2.

Verifica-se um aumento do número de compostos identificados, para ambas as massas de sal analisadas em solução aquosa, quando se passa de 40 para 50°C. De 13 passa-se a 17 compostos identificados na análise com 16 g de sal e de 11 passa-se a 17 compostos identificados na análise com 25 g de sal. Este aumento do número de compostos poderá estar associado ao aumento da volatilidade dos compostos presentes na matriz [21]. Para 60°C o número de compostos identificados praticamente não varia relativamente à análise a 50°C, mantém-se nos 17 na análise com 16 g de sal e passa a 16 na análise com 25 g de sal. Também se avaliou o comportamento das áreas cromatográficas dos compostos identificados com o aumento da temperatura de análise. Verifica-se que para a maioria dos compostos estas aumentam com a subida da temperatura. Os resultados apresentados na Tabela 4.2 foram analisando e comparados estatisticamente. Verifica-se que para 16 g de sal, o aumento da temperatura de 40°C para 50°C faz aumentar a área cromatográfica dos aldeídos e cetonas enquanto a dos restantes grupos químicos se mantém, de 50°C para 60°C a área cromatográfica dos álcoois e fenóis diminui e as restantes mantêm-se. Quando se usam 25 g de sal o aumento da temperatura de 40°C para 50°C provoca o aumento da área cromatográfica dos hidrocarbonetos e dos compostos terpénicos e norisoprenóides, a área cromatográfica dos restantes grupos não

Tabela 4.2 – Efeito da massa de amostra e da temperatura de extracção na análise da composição volátil de soluções aquosas saturadas de sal por SPME-GC-MS; compostos identificados organizados por grupos químicos.

Pico nº	COMPOSTOS IDENTIFICADOS	ID*	Áreas cromatográficas/ (×10 ⁻⁶)							
			16g			25g				
			40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C		
			Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10		
			n=3 (CV)							
Hidrocarbonetos										
22	Pentadecano	B	3,90	-	8,40 (20)	9,42 (14)	-	-	3,70 (20)	7,64 (27)
30	Heptadecano	B	-	-	7,30 (28)	13,32 (18)	-	-	2,77 (15)	9,02 (22)
31	8-Heptadeceno	B	34,87 (69)	87,18 (8)	98,83 (12)	26,90 (24)	52,33 (20)	91,48 (22)		
	Subtotal (área cromatográfica)		36,17 (72)	102,87 (9)	121,57 (12)	26,90 (24)	58,80 (20)	108,15 (19)		
	Subtotal (%)		47,55 (27)	53,43 (2)	53,15 (12)	52,18 (41)	37,70 (4)	46,36 (28)		
Álcoois e Fenóis										
17	3-Octanol	B	-	-	0,44 -	0,41 -	-	-	-	-
47	2-(1,1-Dimetiletil)-fenol	B	5,74 (52)	8,83 (6)	5,98 (6)	8,35 (2)	14,47 (19)	11,05 (1)		
50	2-(1,1-Dimetiletil)-fenol	B	12,09 (44)	22,60 (8)	17,82 (3)	16,16 (2)	35,83 (22)	33,95 (3)		
	Subtotal (área cromatográfica)		17,83 (46)	31,58 (8)	24,00 (2)	24,52 (2)	50,30 (21)	45,00 (2)		
	Subtotal (%)		31,48 (57)	16,41 (2)	10,36 (10)	41,66 (10)	32,20 (6)	18,13 (0)		
Aldeídos e Cetonas										
7	6-Metil-2-heptanona	B	1,09 (27)	0,79 (32)	0,68 (9)	1,23 (42)	1,09 (31)	0,90 (19)		
9	3-Octanona	B, P	7,34 -	6,58 (79)	- -	- -	- -	- -		
12	2,2,6-Trimetil-ciclo-hexanona	B, L	0,67 (6)	0,71 (18)	0,60 (17)	0,85 (6)	1,48 (23)	0,83 (4)		
16	3,5,5-Trimetil-2-ciclo-hexeno-1-ona (α-Isoforona)	B	0,41 -	0,34 (21)	0,28 (8)	0,31 (24)	0,46 (28)	0,43 (23)		
28	6,10-Dimetil-2-undecanona	B	- -	5,87 (17)	7,16 (18)	- -	4,06 (19)	5,76 (33)		
44	6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	B	7,83 -	21,69 (20)	42,48 (32)	- -	10,94 (28)	46,15 (11)		
	Subtotal (área cromatográfica)		6,95 (69)	33,79 (27)	51,20 (28)	2,39 (26)	14,39 (36)	54,06 (8)		
	Subtotal (%)		9,20 (38)	17,27 (18)	22,09 (19)	4,70 (46)	9,69 (46)	22,83 (2)		
Pirróis e Aminas										
57	Benzopirrol (Indol)	B	-	-	- -	0,95 -	- -	- -		
63	Difenilamina	B	-	-	21,81 -	- -	- -	- -		
	Subtotal (área cromatográfica)		0,00 -	0,00 -	21,81 -	0,95 -	0,00 -	0,00 -		
	Subtotal (%)		0,00 -	0,00 -	9,84 -	2,18 -	0,00 -	0,00 -		
Compostos Terpénicos e Norisoprenóides										
5	1,3,3-Trimetil-2-oxabicyclo [2.2.2]octano (1,8-Cineol)	B, P	-	-	- -	- -	0,79 (117)	1,35 -		
13	6-Metil-5-hepteno-2-ona	B, L	0,88 -	- -	- -	1,06 -	0,23 (70)	- -		
24	2,6,6-Trimetil-1-ciclo-hexeno-1-carboxaldeído (β-Ciclocitral)	B, L	- -	1,70 (15)	2,39 (8)	- -	1,83 (21)	2,17 (18)		
34	4-(2,6,6-Trimetil-2-ciclo-hexeno-1-il)-3-buteno-2-ona (α-Ionona)	B, L, P	2,50 (47)	6,23 (7)	7,22 (7)	2,63 (13)	6,62 (24)	8,44 (7)		
37	4-(2,6,6-Trimetil-1-ciclo-hexeno-1-il)-buteno-2-ona (β-Ionona)	B, L, P	3,47 (70)	8,56 (9)	13,35 (2)	1,66 (23)	6,74 (37)	10,93 (9)		
39	trans-β-Ionona-5,6-epóxido	B	- -	2,65 -	5,68 (30)	- -	5,57 (14)	8,54 (7)		
52	5,6,7,7a-Tetraidro-4,4,7a-trimetil-2(4H)-benzofuranona (Di-hidroactinidiolida)	B	3,76 (38)	7,84 (9)	9,68 (16)	4,86 (9)	12,35 (14)	14,19 (70)		
	Subtotal (área cromatográfica)		8,77 (73)	25,21 (9)	33,21 (29)	7,88 (19)	32,02 (27)	44,72 (22)		
	Subtotal (%)		11,77 (16)	13,18 (18)	14,58 (32)	14,62 (5)	20,41 (13)	18,72 (15)		
Totais			69,71 (62)	193,45 (10)	229,25 (17)	53,84 (18)	155,51 (16)	236,93 (8)		

* B - Identificação pelo espectro de massa proposto pela base de dados Wiley 275; L- Confirmação do espectro de massa na literatura; P - Confirmação do tempo de retenção pelo espectro de massa do padrão puro

sofre variação. Com o aumento da temperatura de 50°C para 60°C a área cromatográfica dos hidrocarbonetos e dos aldeídos e cetonas aumenta e mantém-se a mesma para os restantes grupos químicos. O aumento da temperatura aumenta o coeficiente de difusão dos analitos, por outro lado, pode aumentar a solubilidade dos compostos na matriz dificultando a sua passagem para a fase de vapor [19, 21].

Na Figura 4.3 estão representadas as áreas cromatográficas totais dos compostos identificados para cada uma das análises a que se refere a Tabela 4.2. Observando a Figura 4.3 verifica-se que a área cromatográfica total dos compostos identificados tem tendência a aumentar com o aumento da temperatura e é semelhante para ambas as massas de sal usadas em solução. Analisando estatisticamente as diferenças observadas ($p \leq 0,05$) verifica-se que no ensaio com 16 g de sal não há diferença na área cromatográfica total quando se passa de 50°C para 60°C. No que se relaciona com o aumento da massa de sal, para nenhuma temperatura de análise se verificam diferenças significativas nas áreas cromatográficas totais. No entanto observa-se que para os hidrocarbonetos as áreas cromatográficas diminuem com o aumento da massa de sal para a temperatura de 50°C e que o inverso se verifica para os álcoois e fenóis à temperatura de 60°C (Tabela 4.2). Quanto aos CV's não se verificam grandes diferenças, embora sejam na sua maioria superiores para a análise com 25 g de amostra.

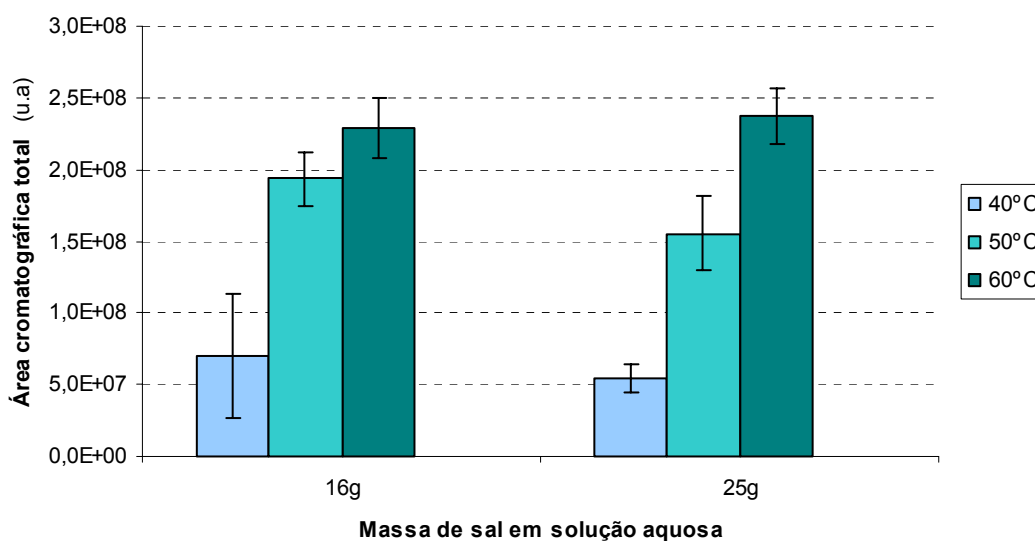


Figura 4.3 – Áreas cromatográficas totais dos compostos identificados na análise do sal em solução: efeito do aumento da temperatura (40°C, 50°C e 60°C) e massa de sal (16 g e 25 g). (Dados obtidos a partir da Tabela 4.2)
(u.a.) – unidades arbitrárias

Tendo em conta estes resultados estabeleceu-se que a temperatura mais indicada para aplicação da metodologia de SPME-GC-MS na análise da composição volátil do sal seria de 60°C. Por não haver diferenças significativas na área cromatográfica total dos

compostos identificados entre as massas de sal analisadas a 60°C, foi necessário observar os CV's de cada composto identificado em ambas as análises e concluir qual apresentava valores superiores. Visto que 60% dos compostos apresenta um CV superior na análise com 25 g de sal, optou-se por prosseguir o estudo analisando soluções aquosas saturadas com 16 g de sal marinho. Outra razão que pesou nesta escolha foi o facto de se gastar menor quantidade de amostra.

➤ MODO DE APRESENTAÇÃO DA AMOSTRA

Para confirmar que o modo de apresentação da amostra em que o sal é analisado em solução aquosa era de facto a mais adequada, tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios preliminares, e para uma comparação rigorosa dos resultados, decidiu-se analisar uma amostra de sal de 2005 da marinha Peijota no seu estado sólido e em solução aquosa, à temperatura de 60°C, aplicando 18h de tempo de espaço de cabeça e usando a mesma razão β ($1/\beta = 0,5$) (Ensaio 11 e 12). Usou-se sal de 2005 por escassez de amostra de 2004. Simultaneamente, como controle (branco), analisou-se às mesmas condições uma solução aquosa saturada de sal p.a. (99,5% NaCl) (Ensaio 13). Na Tabela 4.3 encontram-se reunidos os resultados destas análises.

Os resultados da Tabela 4.3 estão de acordo com o observado com os ensaios preliminares. A área cromatográfica total dos compostos identificados foi superior cerca de 48% na análise da solução aquosa saturada de sal. Os compostos identificados na solução aquosa saturada de sal que foram comuns à referência (Ensaio 13) e cuja área cromatográfica foi da mesma ordem de grandeza ou inferior (assinalados a azul), não foram contabilizados. Estes compostos, considerados como tendo origem na água, foram os seguintes: octanal, nonanal, BHT-aldeído, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, miristato de isopropilo e geranil acetona.

Nos cromatogramas resultantes da análise ao sal sólido foram identificados 18 compostos enquanto que para a solução aquosa saturada de sal, analisada às mesmas condições e desprezando os compostos identificados como sendo da água, foram identificados 22 compostos.

Tabela 4.3 – Efeito do modo de apresentação da amostra na análise da composição do sal por SPME-GC-MS. Análise de sal p.a. em solução aquosa (referência); compostos organizados por grupos químicos.

Tr (min)	Pico nº	COMPOSTOS IDENTIFICADOS	ID*	Áreas cromatográficas (×10 ⁻⁶)			
				Sal p.a. (99,5% NaCl)		Sal marinho	
				Sol. aquosa sat.		Sólido	Sol. aquosa sat.
				16 g		35 g	16 g
				Ensaio 13		Ensaio 11	Ensaio 12
				n=3 (CV)			
15,96 22,01 22,86 23,89 40,59	22 30 31 32 46	Hidrocarbonetos Pentadecano Heptadecano 8-Heptadeceno Heptadecadieno 1,3-Dimetil-1,3-difenilciclo-butano Subtotal (área cromatográfica) Subtotal (%)	B B B B B	- - - - - - - - 3,60 (34) 3,60 (34) 1,71 (38)	- - - - 81,86 (9) - - - - 81,86 (9) 19,58 (29)	21,81 (44) 11,95 (25) 336,93 (26) 17,96 (19) - - 388,65 (24) 53,28 (44)	
12,20 15,01 33,40 29,24 46,09	17 20 40 36 53	Álcoois e Fenóis 3-Octanol 2-Etil-1-hexanol 2-Metil-1-dodecanol 2,6-bis(1,1-Dimetiletil)-4-metil-fenol (BHT) 2,4-bis(1,1-Dimetiletil)-fenol Subtotal (área cromatográfica) Subtotal (%)	B, L B, L B B, L, P B	4,81 (122) - - - - vt - 3,99 (52) 8,79 (53) 3,92 (37)	- - - - - - - - - - 0,00 - 0,00 -	- - 1,42 (25) 4,33 (43) - - - - - - 5,74 (26) 0,59 (32)	
8,54 11,81 15,23 47,37 52,14 7,13 8,99 17,85 21,16 30,63 37,26 38,46 39,39 48,27 50,85	11 15 21 54 60 7 12 23 28 38 43 44 45 56 59	Aldeídos e Cetonas Octanal Nonanal Decanal 2-(Fenilmetileno)-octanal (α-Hexilcinamaldeído) BHT-aldeído 6-Metil-2-heptanona 2,2,6-Trimetil-ciclo-hexanona 2-Undecanona 6,10-Dimetil-2-undecanona 8-Pentadecanona 2,6-di(t-Butil)-4-hidroxi-4-metil-2,5-ciclohexadieno-1-ona 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona 3,4-Di-hidro-3,3,6,8-tetrametil-1(2H)-naftalenona 1-(3-Etil-5,6,7,8-tetraidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil)-etanona (Acetiletiltetrametiltetralina) Difenil-metanona (Benzofenona) Subtotal (área cromatográfica) Subtotal (%)	B B, L B B B B, L B, L B B B B B B B B, L	1,54 (67) 9,25 (72) 27,67 (122) - - 4,27 (47) - - - - 3,71 (53) - - 17,71 (29) - - - - 8,36 (30) - - 36,60 (20) 109,11 (21) 50,37 (12)	- - - - - - 6,45 (33) - - 0,26 (23) 0,26 (6) - - 1,90 (28) - - 9,57 (53) 35,77 (33) - - 3,76 (39) - - 56,09 (5) 13,53 (32)	1,46 (28) 8,93 (59) - - 4,41 (32) 2,15 (65) 0,32 (27) 0,24 (45) - - 3,66 (9) - - 38,65 (114) 42,25 (28) - - 3,24 (69) - - 92,66 (59) 11,05 (37)	
6,90 13,15 20,26 35,21 44,40 47,62 54,50 60,31 11,18	6 18 27 42 51 55 61 64 14	Ésteres e Tioéteres Hexanoato de etilo Octanoato de etilo Decanoato de etilo 1-Metiletil-tetradecanoato (Miristato de isopropilo) Di-hidro 2-pent-2-enil-3-oxo-1-ciclo-pentilacetato (Di-hidrometiljasmonato) Ftalato de etilo Ftalato de isobutilo Ftalato de butilo 2,3,4-Tritiapentano Subtotal (área cromatográfica) Subtotal (%)	B, L, P B, L, P B, L, P B B, L B, L B B B	1,40 - 19,95 (136) 6,96 (14) 22,13 (86) - - 5,65 (92) 39,13 (20) - - - - - - 91,96 (21) 42,37 (13)	- - - - - - 20,75 (64) 9,34 (60) 161,57 (134) - - 36,03 (45) 0,31 - - - 227,79 (85) 44,39 (45)	0,46 - 9,35 (61) 3,89 (60) 27,30 (63) 7,68 (59) 10,10 (58) 179,39 (79) 108,11 (77) - - - - 305,29 (77) 32,38 (67)	
6,20 7,46 10,27 18,28 26,49 27,39 29,90 45,10 50,73	5 8 13 24 34 35 37 52 58	Compostos terpênicos e norisoprenóides 1,8-Cineol 1-Metil-4-(1-metiletil)-benzeno (p-Cimeno) 6-Metil-5-hepteno-2-ona β-Ciclocitral α-Ionona 6,10-Dimetil-5,9-undecadieno-2-ona (Geranil acetona) β-Ionona Di-hidroactinidiolida 2,4,4-Trimetil-3-(3-oxo-1-butenil)-2-ciclo-hexeno-1-ona (4-Oxo-β-ionona) Subtotal (área cromatográfica) Subtotal (%)	B, P B, L, P B, L B, L B, L, P B, P B, L, P B B	- - - - - - - - - - 4,90 (26) - - - - - - - - 4,90 (26) 2,43 (12)	- - - - 2,90 (6) 6,51 (18) - - - - 18,04 (50) 58,69 (12) 4,13 (12) - - 90,27 (14) 22,50 (45)	0,34 - 1,54 (24) 0,51 (59) - - 5,76 (6) 14,82 (18) 12,65 (6) - - - - - - 20,58 (4) 2,90 (50)	
Totais				216,74 (17)	456,01 (43)	811,01 (38)	

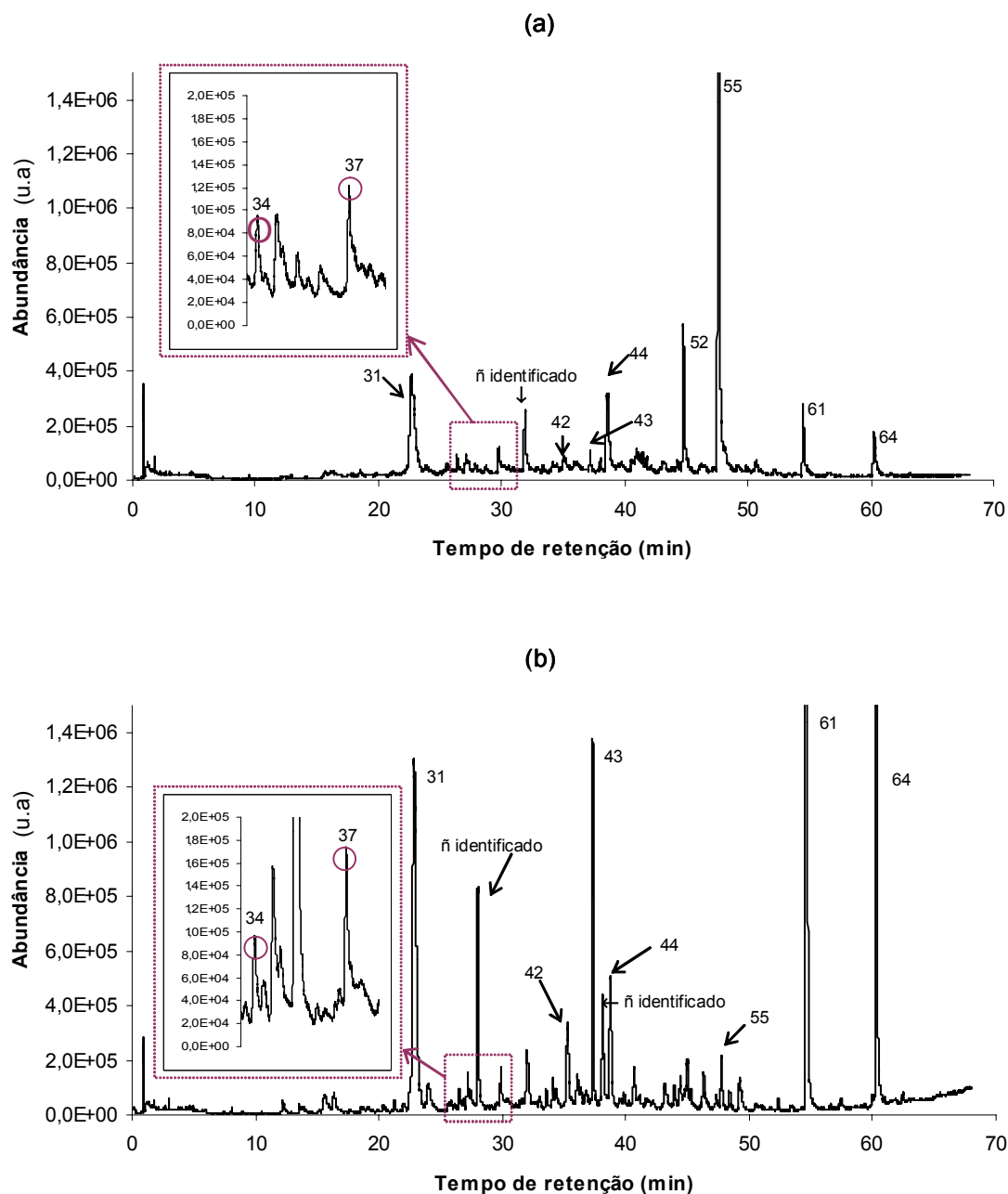


Figura 4.4 – (a) Cromatograma do sal sólido (35g) a 60°C e aplicando 18 h de tempo de espaço de cabeça. (b) Cromatograma da solução aquosa saturada com 16 g de sal a 60°C e aplicando 18 h de tempo de espaço de cabeça.
(u.a.) – unidades arbitrárias

A maioria dos compostos identificados na análise ao sal sólido são também identificados na análise à solução aquosa saturada de sal, com exceção dos

norisoprenóides β -ciclocitral, di-hidroactinidiolida e 4-oxo- β -ionona e do tioéter 2,3,4-tritriapentano. Compostos da família dos álcoois só são identificados na análise da solução aquosa saturada de sal. A razão para que determinados compostos só sejam identificados quando o sal se encontra em solução poderá estar relacionada com a possibilidade de no sal sólido, como já foi referido anteriormente, estes se encontrarem retidos nos cristais. Quanto ao facto de existirem compostos que só são identificados na análise ao sal sólido pode dever-se ao efeito de dissolução destes compostos pela água, quando a análise é em solução saturada, o que dificulta a sua libertação para o espaço de cabeça. Outra razão para que existam compostos só identificados no sal sólido poderá ser a quantidade de amostra usada na análise ao sal sólido ser superior (35 g), o que implica que estes compostos também estejam presentes em maior quantidade e possam ser detectados.

Na Figura 4.4 estão representados os cromatogramas resultantes da análise ao sal sólido e da análise da solução aquosa saturada com 16 g de sal, à temperatura de 60°C e aplicando 18 h de tempo de espaço de cabeça. Nestes estão evidenciados os tempos de retenção dos picos mais intensos assim como da α - e β -ionona (picos nº 34 e 37, respectivamente). O cromatograma da análise do sal marinho em solução aquosa apresenta uma melhor resolução e há um incremento das áreas cromatográficas.

Nesta análise também se verificou que para o sal da marinha Peijota 2005 (Ensaio 12) foram identificados novos compostos relativamente ao sal da marinha Peijota de 2004 analisado às mesmas condições (Ensaio7). Outro aspecto relevante foi o aumento significativo da área cromatográfica total. O facto de estarmos perante amostras de sal de diferentes anos implica algumas variáveis. Por exemplo, o local de recolha de amostra na marinha poderá ter variado de um ano para o outro, assim como poderá ter havido maior perda de compostos voláteis para o sal de 2004, armazenado por um período de tempo mais longo.

Finalizada a fase de optimização da metodologia de SPME-GC-MS para a análise da composição volátil do sal, a mesma foi aplicada a amostras de sal de diferentes origens. (ver capítulo ‘Material e Métodos’, 3.3.4)

4.3 Caracterização da composição volátil do sal de diferentes origens

Foram analisadas, pela metodologia de SPME-GC-MS anteriormente desenvolvida, amostras de sal marinho provenientes de diferentes marinhas de Aveiro e de outras origens, tal como é referido no capítulo ‘Material e Métodos’. Todos os cromatogramas foram analisados, procedendo-se à identificação e integração dos picos existentes. De acordo com os resultados obtidos na fase de optimização da metodologia, os compostos que se considerou serem provenientes da água (Ensaio 13) não foram contabilizados.

Os cromatogramas obtidos para cada amostra de sal foram processados recorrendo à análise por componentes principais com o objectivo de avaliar a possibilidade de identificar diferenças entre os sais analisados relacionadas com a presença de determinados compostos.

Foi também estimada a quantidade de β -ionona nos sais analisados. Este é um dos compostos que poderá ser importante para o aroma do sal.

4.3.1 COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DO SAL MARINHO DE AVEIRO

Analisou-se sal da safra de 2004 das marinhas Desgarrada e Passã, e sal da safra de 2005 de todas as marinhas activas nesse ano, com excepção da marinha Troncalhada. Os resultados da análise dos cromatogramas destes sais encontram-se na Tabela 4.4.

A análise da composição volátil do espaço de cabeça do sal marinho de Aveiro permitiu a identificação de compostos da família dos hidrocarbonetos, álcoois, fenóis, aldeídos, cetonas, ésteres, compostos terpénicos e norisoprenóides. A composição volátil do sal das diferentes marinhas não é idêntica, variando no número e no tipo de compostos identificados.

Os grupos de compostos que no geral mais contribuem para a área cromatográfica total do sal marinho de Aveiro são os hidrocarbonetos e os ésteres. No entanto, o grupo dos aldeídos e cetonas apresenta uma área cromatográfica expressiva nos sais das marinhas 18 Carmonetes e Passã (2005) e o grupo dos álcoois e fenóis no sal da marinha Senitra.

O grupo de compostos que está em maior número na maioria dos sais analisados é o dos aldeídos e cetonas. No sal das marinhas Desgarrada, Podre e Caniceira, são os

compostos terpénicos e norisoprenóides que estão presentes em maior número, e no sal da marinha Grã Caravela são os hidrocarbonetos.

Também é importante referir que se observam valores de coeficiente de variação (CV) muito elevados, variando até 160%. Esta variação está relacionada com o facto de se estar perante a análise de uma amostra natural. A diferença no local onde o sal cristaliza dentro de uma marinha poderá influenciar a sua composição volátil.

As marinhas de Aveiro cujo sal apresenta um maior número de compostos identificados são a Peijota e a Grã Caravela. Para o sal de cada uma destas marinhas foram identificados 21 e 23 compostos, respectivamente. O sal proveniente da marinha Caniceira foi o que apresentou um menor número de compostos identificados, 12 no total.

Verifica-se que a maioria dos compostos é identificado no sal de apenas algumas marinhas, no entanto existem alguns que estão presentes no sal de todas ou quase todas as marinhas de Aveiro. O hidrocarboneto 8-heptadeceno, o álcool 2-etil-1-hexanol, o fenol BHT, o éster di-hidrometiljasmonato e os norisoprenóides 6-metil-5-hepteno-2-ona e β -ionona são compostos que foram identificados no sal de todas as marinhas, o norisoprenópide α -ionona só não foi identificado no sal de uma marinha, a cetona 2,2,6-trimetil-ciclo-hexanona e o aldeído α -hexilcinamaldeído não foram identificados no sal de duas marinhas e as cetonas 6-metil-2-heptanona e acetiletetrametiltetralina não foram identificadas no sal de apenas 3 marinhas. Dos compostos referidos anteriormente, que contribuem para a caracterização da composição volátil do sal de Aveiro na sua globalidade, pensa-se que grande parte seja de origem natural embora também se encontrem compostos que podem ser derivados da poluição do meio.

Tabela 4.4 – Compostos voláteis e semi-voláteis identificados nos sais das marinhas de Aveiro (2005); compostos organizados por grupos químicos.

Tr (min)	Pico nº	COMPOSTOS IDENTIFICADOS	ID*	Áreas cromatográficas (x10 ⁻⁶)											Santiago da Fonte
				SAL MARINHO DE AVEIRO											
				Desgarrada	18 Carmonetes	Passá (2004)	Passá	Podre	Caniceira	Senitra	Peijota	Grá Caravela			
n=3 (CV)															
2,49	1	Hidrocarbonetos	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,13 (71)	-	-
5,93	4		B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,64 (56)	-	-
7,96	10		B, P	0,64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13,38	19		B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,30	-	-
15,96	22		Pentadecano	B	-	6,81 (40)	-	6,38 (55)	-	-	-	21,81 (44)	10,08 (19)	-	5,98 (42)
19,02	25		Hexadecano	B	-	-	-	-	-	-	-	-	4,00 (75)	-	-
22,01	30		Heptadecano	B	-	5,44	-	8,51 (29)	-	-	-	11,95 (25)	9,64 (23)	-	10,94 (47)
22,86	31		8-Heptadeceno	B	11,84 (11)	16,14 (17)	57,03 (18)	53,08 (12)	47,47 (18)	39,56 (10)	vt	336,93 (26)	132,93 (12)	-	91,56 (34)
23,89	32		Heptadecadieno	B	-	-	11,03 (1)	-	-	-	-	17,96 (19)	6,77 (51)	-	vt
			Subtotal (área cromatográfica)		12,06 (8)	24,76 (17)	64,38 (26)	67,97 (18)	47,47 (18)	39,56 (10)	0,00	388,65 (24)	170,25 (18)	108,48 (36)	
		Subtotal (%)		15,39 (21)	7,31 (26)	37,51 (18)	34,68 (9)	34,75 (19)	32,17 (15)	0,00	55,15 (40)	58,24 (23)	41,72 (36)		
15,01	20	Alcoóis e Fenóis	B, L	2,60 (80)	vt	0,88 (16)	2,15 (29)	5,86 (22)	1,33 (23)	2,10 (111)	1,42 (25)	1,24 (9)	2,68 (43)		
29,24	36		B, L, P	vt	7,65 (28)	1,19	8,74 (62)	11,33 (101)	6,98 (74)	33,40	vt	36,04 (121)	11,67 (98)		
42,54	49		B	-	-	2,51 (14)	-	-	-	0,83 (74)	-	5,56 (8)	-	-	
44,38	50		B	-	-	-	-	-	6,02 (6)	-	-	-	-	-	
		Subtotal (área cromatográfica)		2,60 (80)	7,65 (28)	3,49 (42)	10,89 (45)	23,21 (54)	8,31 (62)	13,78 (130)	0,95 (91)	42,84 (103)	14,35 (80)		
		Subtotal (%)		2,93 (65)	2,30 (39)	2,02 (35)	6,01 (66)	17,08 (57)	6,62 (60)	11,27 (80)	0,10 (88)	13,88 (96)	5,30 (70)		
5,69	3	Aldéidos e Cetonas	B, L	0,70 (36)	-	1,30 (37)	-	-	-	3,49 (37)	-	-	-	-	
47,37	54		B	1,12 (64)	5,40 (10)	-	1,35 (48)	-	-	2,84 (23)	4,41 (32)	1,87 (32)	3,05	-	
7,13	7		B	vt	-	0,79 (12)	0,38	-	0,85 (5)	-	0,32 (27)	0,31 (14)	0,53 (26)		
7,52	9		B, P	0,94	-	4,83	-	6,94 (156)	-	-	-	14,72 (136)	23,82	-	
8,99	12		B, L	-	-	0,81 (26)	0,05	0,43 (11)	0,57 (3)	0,12 (9)	0,24 (45)	0,20 (38)	0,23 (56)		
21,16	28		B	-	-	vt	3,86 (12)	-	-	-	3,66 (9)	3,69 (11)	6,26 (18)		
37,26	43		B	-	-	18,76 (40)	-	-	-	-	-	-	-	-	
38,46	44		B	-	-	27,25 (6)	41,57 (17)	-	-	-	42,25 (28)	29,31 (18)	33,27 (10)	-	
48,27	56		B	-	-	4,26 (15)	1,93 (23)	1,32 (45)	-	-	3,51 (38)	3,24 (69)	1,40 (25)	2,15 (46)	
			Subtotal (área cromatográfica)		1,90 (71)	91,09 (3)	25,21 (34)	48,24 (17)	7,37 (147)	1,42 (3)	7,85 (34)	54,01 (29)	46,60 (24)	53,43 (21)	
		Subtotal (%)		2,18 (66)	26,80 (17)	15,07 (38)	24,66 (10)	5,15 (144)	1,15 (3)	9,06 (84)	7,20 (10)	15,68 (17)	20,36 (9)		
44,40	51	Ésteres	B, L	4,53	14,88 (8)	11,25 (22)	20,70 (106)	vt	5,94 (24)	7,83 (62)	7,68 (59)	7,45 (12)	7,04 (42)		
47,62	55		B	7,26 (81)	-	11,26 (29)	-	13,64 (31)	9,39 (7)	-	10,10 (58)	-	-	-	
54,50	61		B	32,40 (16)	-	30,23 (18)	-	23,91 (33)	29,31 (12)	106,92 (80)	179,39 (79)	-	-	-	
60,31	64		B	17,12 (29)	205,76 (31)	-	37,07 (23)	-	-	-	108,11 (77)	15,05 (26)	59,63 (49)		
		Subtotal (área cromatográfica)		58,28 (23)	220,64 (29)	52,75 (10)	57,77 (49)	37,56 (11)	44,64 (12)	114,75 (78)	305,29 (77)	22,50 (20)	66,67 (46)		
		Subtotal (%)		72,23 (4)	62,87 (11)	31,24 (13)	28,11 (28)	27,52 (13)	36,05 (7)	71,60 (30)	34,55 (69)	7,72 (27)	25,54 (44)		

- RESULTADOS E DISCUSSÃO -

Tr (min)	Pico nº	(cont. Tabela 4.4) COMPOSTOS IDENTIFICADOS	ID*	Áreas cromatográficas (×10 ⁻⁶)										
				SAL MARINHO DE AVEIRO										
				Desgarrada	18 Carmonetes	Passã (2004)	Passã (2005)	Podre	Caniceira	Senitra	Peijota	Grã Caravela	Santiago da Fonte	
Média (CV)														
5,58	2	Compostos Terpênicos e Norisoprenóides 1-metil-4-(1-metiletenil)- ciclo-hexeno (Limoneno) 1,8-Cineol p-Cimeno 6-Metil-5-hepten-2-ona β-Cidocitral α-Ionona β-Ionona	B, L	-	-	0,23 (51)	-	-	-	-	-	-	-	
6,20	5		B, P	-	-	-	0,68 (126)	-	-	-	0,39 (59)	0,34	-	
7,46	8		B,L,P	0,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10,27	13		B, L	1,28 (48)	0,56 (41)	2,88 (7)	1,54 (29)	4,65 (33)	1,93 (35)	1,28 (13)	1,54 (24)	-	0,41 (11)	
18,28	24		B, L	0,35 (35)	-	1,52 (13)	-	1,38 (5)	2,26 (5)	-	0,51 (59)	0,66 (44)	1,21 (39)	
26,49	34		B,L,P	1,00 (17)	-	5,96 (23)	2,03 (7)	3,51 (7)	7,24 (12)	2,54 (54)	-	-	-	-
29,90	37		B,L,P	3,33 (35)	1,86 (20)	13,39 (1)	8,70 (19)	11,60 (7)	18,20 (10)	2,45 (4)	12,65 (6)	3,55 (7)	3,54 (14)	12,66 (52)
			Subtotal (área cromatográfica)	5,96 (34)	2,42 (15)	23,98 (7)	12,73 (13)	21,14 (9)	29,62 (5)	6,53 (24)	20,58 (4)	13,14 (14)	17,69 (42)	17,69 (42)
			Subtotal (%)	7,27 (20)	0,72 (27)	14,15 (4)	3,61 (9)	15,50 (12)	24,01 (7)	8,08 (91)	3,01 (46)	4,49 (20)	7,07 (52)	7,07 (52)
Totais			80,79 (28)	346,56 (23)	169,80 (10)	197,60 (22)	136,74 (5)	123,55 (5)	142,91 (74)	769,47 (37)	295,32 (7)	260,62 (12)	260,62 (12)	

* B - Identificação pelo espectro de massa proposto pela base de dados Wiley 275; L- Confirmação do espectro de massa na literatura; P - Confirmação do tempo de retenção pelo espectro de massa do padrão puro

Os compostos 6-metil-5-hepteno-2-ona, β -ionona, 2,2,6-trimetil-ciclo-hexanona, α -ionona e 6-metil-2-heptanona já foram identificados em algas, plantas aquáticas e em bactérias [9, 11, 28, 29, 30, 31]. O hidrocarboneto 8-heptadeceno foi identificado em plantas aquáticas e em comunidades bacterianas próprias de ambientes hipersalinos [8, 9] e o éster di-hidrometiljasmonato está relacionado com metabolitos secundários responsáveis pelo mecanismo de defesa das plantas [32, 33].

Os compostos identificados no sal considerados poluentes poderão ter diversas origens. O BHT é um antioxidante usado em alimentos, mas também em tintas e como estabilizante de gasolinas [34, 35, 36], a sua presença pode dever-se à contaminação das águas pelos barcos que circulam na ria assim como à proximidade das marinhas em estudo a uma via rápida. O α -hexilcinamaldeído, um composto reconhecido pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) como GRAS (“generally regarded as safe”) para ser usado em produtos de consumo como fragrância [37], poderá ser um contaminante do meio. A acetiltetrametiltetralina, um almíscar sintético usado como fragrância em produtos como detergentes, cosméticos e perfumes, poderá ser um depósito da atmosfera. Este composto sofre bioacumulação e provoca ecotoxicidade no meio aquático [38]. O 2-etil-1-hexanol é um composto que está presente na natureza e que também pode ser produzido por bactérias e fungos na degradação de substâncias plastificantes [39, 40].

Também é importante procurar compostos voláteis que diferenciem o sal das diferentes marinhas de Aveiro e questionar a sua origem. É o caso dos 4 alcanos (decano, dodecano, tetradecano e hexadecano) apenas identificados no sal da marinha Grã Caravela, do limoneno identificado apenas no sal da marinha Passã (2004), do 1,2,4-trimetilbenzeno com um pico apenas no cromatograma do sal da marinha Desgarrada e o α -(1,1-dimetiletil)-fenol identificado apenas no sal da marinha Podre. O decano é um hidrocarboneto encontrado no fuel, tal como o 1,2,4-trimetilbenzeno, em componente de tintas e produto maioritário de processos de combustão [30, 41, 42, 43]. A justificação para a presença destes compostos no sal analisado poderá ser a mesma que a apresentada para o BHT. Quanto aos hidrocarbonetos dodecano, tetradecano e hexadecano tanto podem ter origem nos combustíveis como serem produtos resultantes do metabolismo do fitoplâncton ou bactérias [13, 44, 45]. O limoneno já foi identificado como um composto orgânico volátil proveniente de microrganismos [46] e o α -(1,1-dimetiletil)-fenol poderá resultar da degradação de antioxidantes contaminantes do meio [47, 48].

4.3.2 COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DE SAL PROVENIENTE DE OUTRAS ORIGENS

Analisou-se a composição volátil de amostras de sal provenientes de outras origens pela metodologia desenvolvida e comparou-se os resultados com os obtidos para o sal marinho de Aveiro. Como é referido no capítulo ‘Material e Métodos’, foram analisadas amostras de sal marinho de Castro Marim, Tavira, Guérande e Ilha do Sal e uma amostra de sal de mina de Espanha, todas de 2004. Analisou-se uma amostra de sal de mina para comparar a sua composição volátil com a de um sal marinho. Os resultados desta análise são apresentados na Tabela 4.5.

Observando os resultados verifica-se que existem diferenças na composição volátil dos diferentes sais. Os grupos de compostos que mais contribuíram para a área cromatográfica total dos cromatogramas dos sais de outras origens analisados foram: os ésteres para os sais de Castro Marim, Tavira e Ilha do Sal, os hidrocarbonetos para o sal de Guérande e os álcoois e fenóis juntamente com os ésteres para o sal de Espanha. O sal de Espanha foi o que apresentou uma menor área cromatográfica total, o que se explica por se tratar de sal de mina.

Dos sais de outras origens analisados, aquele que permitiu a identificação de um maior número de compostos foi o sal proveniente de Guérande (14) e aquele em que foram identificados menos compostos foi o proveniente de Castro Marim (7). Para os sais de Castro Marim, Tavira e Espanha, o grupo dos ésteres foi o que apresentou um maior número de compostos identificados, enquanto que para os sais de Guérande e Ilha do Sal foi o grupo dos compostos terpénicos e norisoprenóides.

Comparando os compostos identificados nestes sais com os compostos identificados no sal marinho de Aveiro, verifica-se que existem compostos em comum, novos compostos e outros que só foram identificados no sal marinho de Aveiro.

Tabela 4.5 – Compostos voláteis e semi-voláteis identificados nos sais de outras origens; compostos organizados por grupos químicos.

Tr (min)	Pico nº	COMPOSTOS IDENTIFICADOS	ID*	Áreas cromatográficas (×10 ⁻⁶)				
				Castro Marim	Tavira	Guérande	Ilha do Sal	Espanha
				n=3 (CV)				
21,58	29	Hidrocarbonetos n.i. (m/z 57, 71, 43, 85, 113, 99, 183, 127, 207)	B, L	- -	- -	28,71 (12)	- -	- -
22,86	31	8-Heptadeceno	B	- -	- -	29,98 (29)	- -	- -
25,10	33	n.i. (m/z 57, 71, 85, 43, 113, 127, 99)	B	- -	- -	13,82 (23)	- -	- -
		Subtotal (área cromatográfica)		0,00 -	0,00 -	72,51 (4)	0,00 -	0,00 -
		Subtotal (%)		0,00 -	0,00 -	53,23 (4)	0,00 -	0,00 -
15,01	20	Álcoois e Fenóis 2-Etil-1-hexanol	B, L	- -	- -	- -	1,50 (94)	5,18 (114)
29,24	36	BHT	B,L,P	1,35 (90)	vt -	vt -	1,32 (27)	2,71 -
42,54	49	2-(1,1-Dimetiletil)-2-metil-fenol	B	2,31 -	3,46 (25)	- -	- -	- -
56,53	62	1-Hidroxi-2-fenilbenzeno (o-Fenilfenol)	B	- -	- -	- -	1,82 (44)	- -
		Subtotal (área cromatográfica)		2,12 (45)	3,46 (25)	0,00 -	3,54 (79)	6,08 (123)
		Subtotal (%)		1,98 (30)	1,53 (15)	0,00 -	3,48 (66)	18,29 (65)
5,69	3	Aldeídos e Cetonas 2-Etil-hexanal	B, L	- -	- -	1,23 (17)	- -	- -
7,13	7	6-Metil-2-heptanona	B	- -	- -	0,88 (8)	- -	- -
7,52	9	3-Octanona	B, P	- -	- -	1,53 (28)	- -	- -
8,99	12	2,2,6-Trimetil-ciclo-hexanona	B, L	- -	- -	5,63 (8)	- -	- -
21,16	28	6,10-Dimetil-2-undecanona	B	- -	- -	- -	- -	- -
48,27	56	Acetiletiltetrametiltetralina	B	- -	- -	- -	- -	0,83 -
		Subtotal (área cromatográfica)		0,00 -	0,00 -	8,76 (11)	0,00 -	0,83 -
		Subtotal (%)		0,00 -	0,00 -	6,46 (15)	0,00 -	1,77 -
44,40	51	Ésteres Di-hidrometiljasmonato	B, L	6,29 -	10,67 (2)	- -	8,99 (17)	1,50 -
47,62	55	Ftalato de etilo	B	7,58 (83)	22,24 (67)	- -	15,33 (17)	1,69 (33)
54,50	61	Ftalato de isobutilo	B	60,00 (19)	89,89 (37)	7,12 (30)	28,29 (30)	17,67 (51)
60,31	64	Ftalato de butilo	B	31,88 (17)	54,24 (49)	- -	16,55 (11)	- -
		Subtotal (área cromatográfica)		101,56 (26)	173,49 (47)	7,12 (30)	69,16 (17)	19,30 (56)
		Subtotal (%)		97,56 (0)	98,10 (0)	5,19 (27)	76,44 (24)	76,83 (13)
5,58	2	Compostos Terpénicos e Norisoprenóides Limoneno	B, L	- -	- -	- -	7,92 (29)	- -
7,46	8	p-Cimeno	B,L,P	- -	0,60 (6)	- -	14,18 (27)	0,81 (58)
19,81	26	(E,E,E)-2,6,6,9-tetrametil-1,4,8-ciclo-undecatrieno (α-Humuleno)	B, P	- -	- -	- -	2,81 (0)	- -
35,02	41	Decaidro-1,1,4,7-tetrametil-(1aR,4S, 4aS, 7R, 7aS, 7bS)- 1H- ciclo-prop[6]azulen-4-ol (Viridiflorol)	B	- -	- -	19,32 (14)	- -	- -
41,19	49	2-(Decaidro-4a-metil-1-metilenonaftalen-7-il)-propan-2-ol (β-Eudesmol)	B	- -	- -	6,02 (37)	- -	- -
10,27	13	6-Metil-5-hepteno-2-ona	B, L	0,43 (48)	0,64 (56)	vt -	0,81 (41)	vt -
26,49	34	α-Ionona	B,L,P	- -	- -	10,16 (4)	- -	- -
29,90	37	β-Ionona	B,L,P	- -	- -	12,40 (13)	7,24 (37)	- -
		Subtotal (área cromatográfica)		0,43 (48)	1,04 (57)	47,90 (7)	22,25 (85)	0,81 (58)
		Subtotal (%)		0,46 (74)	0,88 (107)	35,12 (4)	20,08 (84)	4,29 (71)
		Totais		104,11 (26)	176,84 (47)	136,30 (4)	94,95 (31)	26,47 (69)

* B - Identificação pelo espectro de massa proposto pela base de dados Wiley 275; L- Confirmação do espectro de massa na literatura; P - Confirmação do tempo de retenção pelo espectro de massa do padrão puro

De acordo com a Tabela 4.5, nos sais de outras origens analisados foram identificados compostos encontrados na generalidade dos sais marinhos de Aveiro. O norisoprenóide 6-metil-5-hepteno-2-ona foi identificado em todos os sais de outras origens analisados, o éster di-hidrometiljasmonato só não foi identificado no sal de Guérande, o álcool 2-etil-1-hexanol só não foi identificado nos sais da Ilha do Sal e de Espanha, o norisoprenóide β -ionona só não foi identificado nos sais de Guérande e Ilha do Sal, os compostos 8-heptadeceno, α -ionona, 2,2,6-trimetil-ciclo-hexanona e 6-metil-2-heptanona só não foram identificados no sal de Guérande e a cetona acetiletetrametiltetralina só não foi identificada no sal de Espanha. O α -hexilcinamaldeído não foi detectado em nenhuma das amostras de sal de outras origens.

Como novos compostos foram identificados no sal marinho da Ilha do Sal o α -humuleno e o *o*-fenilfenol, e no sal marinho de Guérande foram identificados o composto viridiflorol, o β -eudesmol e dois hidrocarbonetos (m/z 57, 71, 43, 85, 113, 99, 183, 127, 207 e m/z 57, 71, 85, 43, 113, 127, 99).

O α -humuleno, o β -eudesmol e o viridiflorol são sesquiterpenos que já foram identificados em plantas e no caso do β -eudesmol foram encontrados registos de sua presença em fungos aquáticos [49, 50, 51, 52]. O *o*-fenilfenol é um composto usado como fungicida em alimentos e outros produtos, como madeira e têxteis [53]. Pensa-se que a sua presença no sal possa ter origem na água de abastecimento das salinas.

A variabilidade das áreas cromatográficas dos compostos identificados nos sais de outras origens analisados também se revelou elevada. No sal de Castro Marim o coeficiente de variação (CV) mais elevado foi de 146%, no sal de Tavira foi de 67%, no sal de Guérande foi de 37%, no sal da Ilha do Sal foi de 101% e no sal de Espanha foi de 136%. A justificação para este facto é a mesma apresentada para o sal marinho de Aveiro, visto que estamos perante a análise de um produto natural.

Atendendo aos resultados obtidos para os sais de diferentes origens, podemos identificar como componentes exclusivos do sal de Aveiro os compostos decano, dodecano, tetradecano e hexadecano identificados no sal da marinha Grã Caravela, o 1,2,4-trimetil-benzeno identificado no sal da marinha Desgarrada, o α -(1,1-dimetiletil)-fenol identificado no sal da marinha Podre, o 2,6-di(*t*-butil)-4-hidroxi-4-metil-2,5-ciclo-hexadien-1-ona identificado no sal das marinhas 18 Carmonetes e Passã (2004), o 1,8-cineol identificado no sal das marinhas Passã (2005), Senitra e Peijota, o

heptadecadieno identificado no sal das marinhas Passã (2004), Peijota, Grã Caravela e Santiago da Fonte, o β -Ciclocitral identificado no sal das marinhas Desgarrada, Passã (2004), Podre e Caniceira, o pentadecano, o heptadecano e o 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona identificados no sal das marinhas 18 Carmonetes, Passã (2005), Peijota, Grã Caravela e Santiago da Fonte e o α -hexilcinamaldeído que só não foi identificado no sal das marinhas Passã (2004), Podre e Caniceira.

4.3.3 ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS DOS CROMATOGRAMAS

Foi aplicada uma análise por componentes principais (PCA) aos cromatogramas de todas as réplicas dos sais analisados neste estudo, incluindo o sal p.a.

O objectivo foi estudar as principais fontes de variabilidade entre os sais analisados, detectando os compostos (tempos de retenção) responsáveis pela possível distinção entre amostras. Como se referiu no capítulo ‘Material e Métodos’ foi necessário um pré-tratamento dos dados para corrigir as diferenças observadas nos tempos de retenção dos compostos identificados. O problema da reprodutibilidade associada à injeção manual da amostra no injector do GC assim como a variação da pressão do gás que foi usado como fase móvel na cromatografia em fase gasosa, faz com que a amostra seja eluída pela coluna do GC com velocidades um pouco diferentes que vão resultar em pequenas diferenças no tempo de retenção a que os compostos da mistura são detectados ao longo de mais de 1h de programa. Recorreu-se a um programa de ajuste automático (Dynamic Time Warping (DTW) – Correlation Optimized Warping (COW)). Na Figura 4.5 apresenta-se a sobreposição dos cromatogramas antes e depois do ajuste automático. Observando a figura, verifica-se que os ajustes efectuados decorrem de pequenas variações nos tempos de retenção nos compostos, muitas vezes só detectadas com ampliação dos cromatogramas.

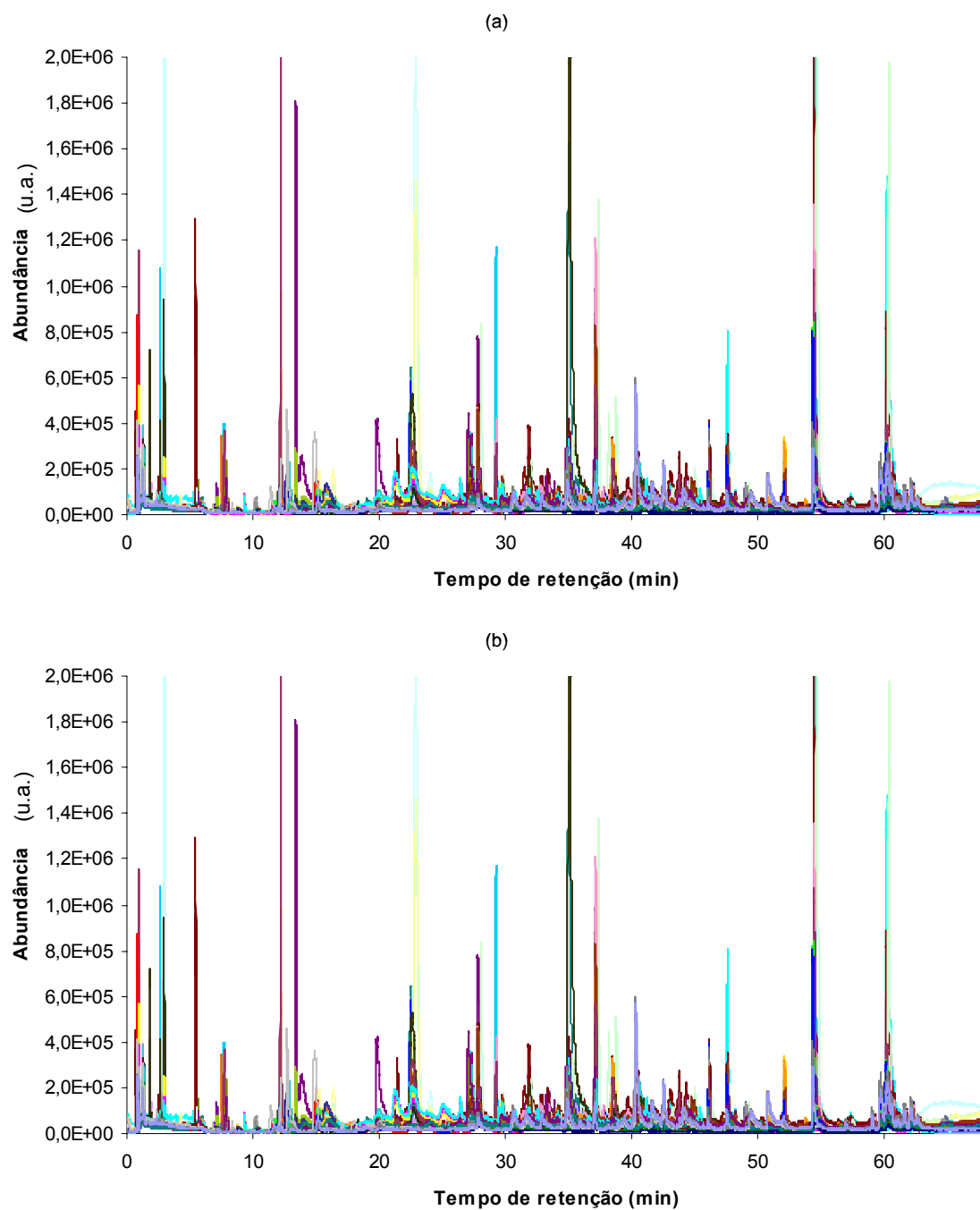


Figura 4.5 – Sobreposição dos cromatogramas de todos os sais analisados pela metodologia de SPME-GC-MS implementada (a) sem correção e (b) com correção por ajuste automático pelo programa COW.

- Gráfico de dispersão das coordenadas factoriais de PC1 *versus* PC2

Na Figura 4.6-a é apresentado o gráfico de dispersão dos scores de PC1 *versus* PC2, que explica 37,2% da variabilidade total entre as amostras. Ao longo do eixo PC1, que representa 21,3% da variabilidade total, observa-se alguma separação entre amostras das diferentes origens, sendo esta mais evidente para as três réplicas do sal de Guérande que se encontram isoladas numa zona mais positiva deste eixo. A razão da percentagem de variabilidade explicada pelo PC1 ser baixa deve-se a haver muita informação para poucas amostras e principalmente pela existência de réplicas muito diferentes entre si, inerente ao facto de se estar a estudar uma amostra natural. O eixo PC2, que explica 15,9% da variabilidade total, distingue as réplicas do sal p.a. e dos sais da marinha Grã Caravela e Peijota.

O perfil das contribuições factoriais de PC1 (Figura 4.6-b) mostrou, no lado positivo do eixo, uma banda mais intensa ao tempo de retenção 35,02 min e no lado negativo do eixo duas bandas mais intensas aos tempos de retenção 54,42 min e 60,31 min. A banda mais intensa a 35,02 min foi atribuída ao viridiflorol e as bandas mais intensas do PC1 negativo foram atribuídas ao ftalato de isobutilo e ao ftalato de butilo, respectivamente. O viridiflorol foi identificado apenas no sal marinho de Guérande o que explica a posição das réplicas deste sal no mapa de scores, embora esta também esteja a ser influenciada pela presença dos compostos atribuídos às bandas a 21,58; 26,49 e 29,90 min, n.i. (m/z 57, 71, 43, 85, 113, 99, 183, 127, 207), α -ionona e β -ionona, respectivamente. As amostras que se situam do lado negativo de PC1 são as que apresentam maiores áreas cromatográficas para os ftalatos de butilo e isobutilo.

O perfil das contribuições factoriais de PC2 (Figura 4.6-c) apresenta uma banda muito intensa a 22,86 min, no PC2 negativo, e três bandas mais intensas no PC2 positivo a 13,30; 15,15 e 40,59 min. A localização das réplicas do sal p.a. no PC2 positivo do mapa das coordenadas factoriais deve-se ao composto 1,3-dimetil-1,3-difenilciclo-butano que só é identificado neste sal. Este é atribuído à banda a 40,59 min, referida anteriormente.

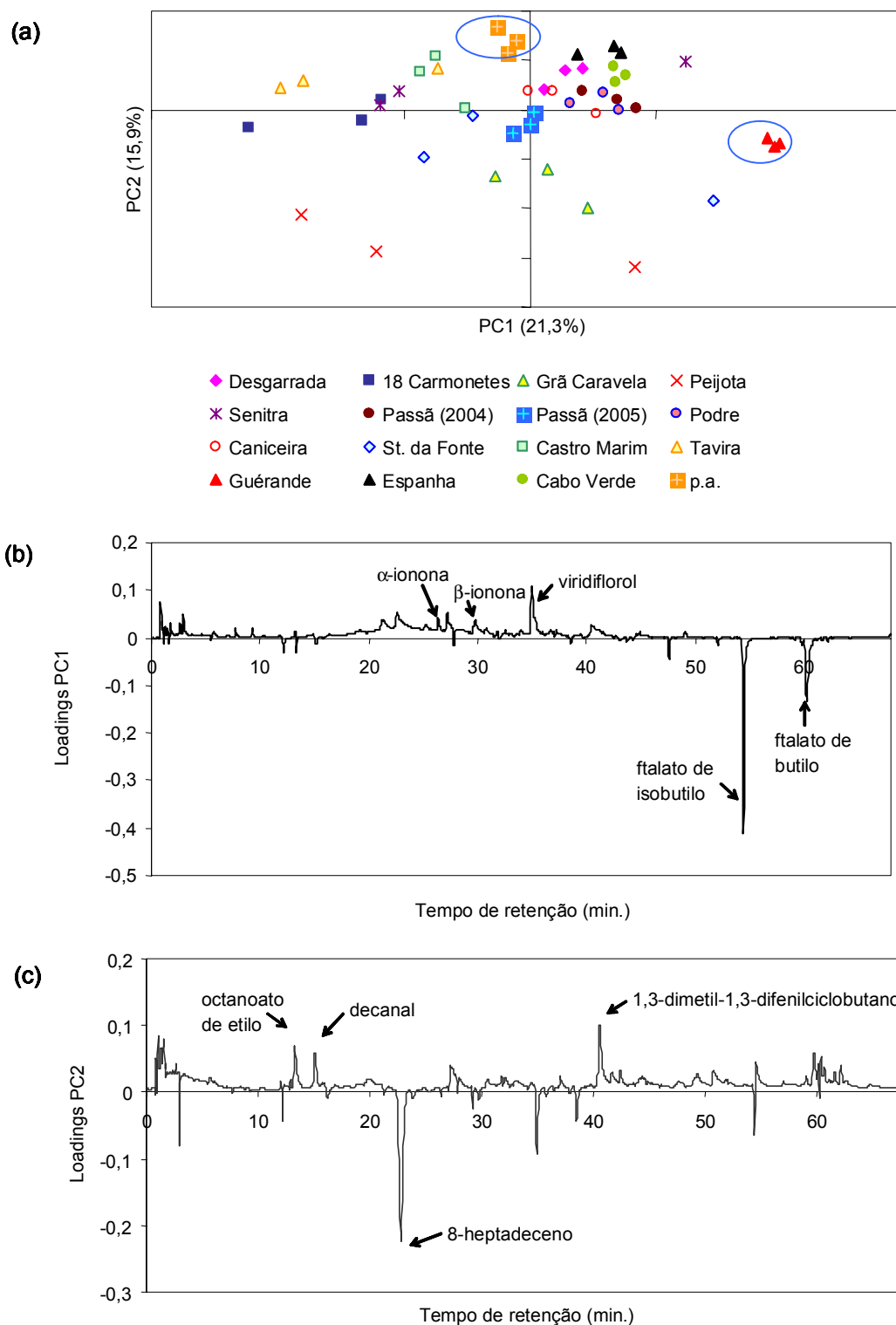


Figura 4.6 - PCA dos cromatogramas das amostras de sal analisadas. (a) Gráfico de dispersão das coordenadas factoriais de PC1 vs. PC2, (b) Perfil das contribuições factoriais de PC1 e (c) Perfil contribuições factoriais de PC2

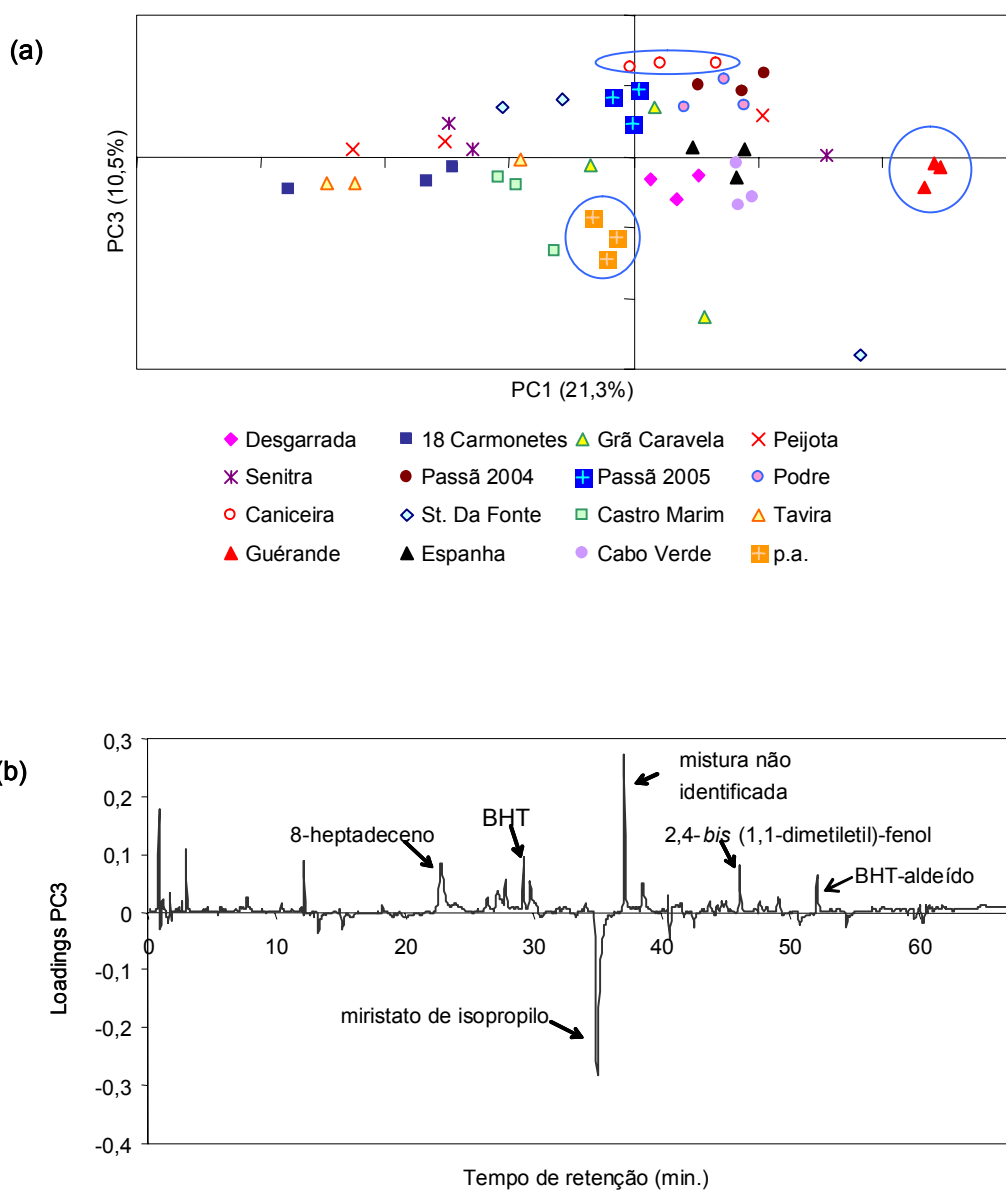


Figura 4.7 - PCA dos cromatogramas das amostras de sal analisadas. (a) Gráfico de dispersão das coordenadas factoriais de PC1 vs. PC3 e (b) Perfil das contribuições factoriais de PC3

O octanoato de etilo e o decanal, estando também presentes na composição volátil do sal p.a. e tendo sido atribuídos às bandas a 13,30 e 15,15 min do PC2 positivo, respectivamente, também contribuem para que estas réplicas se posicionem no PC2 positivo. No que se refere à posição das réplicas dos sais das marinhas Pejota e Grã

Caravela no PC2 negativo, esta é atribuída à presença do 8-heptadeceno, composto que representa a banda a 22,86 min do perfil das contribuições factoriais de PC2. Embora este composto esteja também presente na maioria dos outros sais analisados, apresenta maiores áreas cromatográficas e consequentemente picos com maior intensidade no sal das marinhas Peijota e Grã Caravela.

- Gráfico de dispersão das coordenadas factoriais de PC1 *versus* PC3

O gráfico de dispersão das coordenadas factoriais de PC1 *versus* PC3, apresentado na Figura 4.7-a, explica 31,8 % da variabilidade total entre as amostras. Mais perto do extremo positivo do eixo PC3, que representa 10,5 % da variabilidade total, encontram-se as três réplicas da marinha Caniceira, separadas das restantes amostras, enquanto que no PC3 negativo há uma distinção das réplicas do sal p.a.

Cruzando a informação dos tempos de retenção das bandas mais intensas do perfil das contribuições factoriais de PC3 (Figura 4.7-b) com os dados cromatográficos resultantes da análise destes sais conclui-se que é a presença do 8-heptadeceno (banda a 22,85 min), do BHT (banda a 29,22 min), de uma mistura não identificada (banda a 37,08 min), do 2,4-*bis*(1,1-dimetiletil)-fenol (banda a 46,10 min) e do BHT-aldeído (banda a 52,11 min) e a ausência do miristato de isopropilo (banda a 34,98 min) que determinam a posição no mapa de coordenadas factoriais das amostras da marinha Caniceira. Por outro lado é a presença do miristato de isopropilo, banda mais intensa do PC3 negativo no perfil das contribuições factoriais, a ausência do 8-heptadeceno e a presença vestigial de BHT nas amostras do sal p.a. que determinam a localização das réplicas deste sal no mapa de coordenadas factoriais.

Esta análise global a todos os cromatogramas permitiu identificar alguns dos compostos que podem diferenciar os sais. Nesta análise, o sal de Guérande e o sal p.a. foram os que beneficiaram das principais fontes de variabilidade, destacando-se dos restantes sais.

4.3.4 QUANTIFICAÇÃO DA β -IONONA

O norisoprenóide β -ionona (Figura 4.8), com descritor de aroma a violeta, é um composto orgânico volátil identificado na maioria dos sais analisados. Comparando com os restantes compostos identificados no sal, este apresenta um baixo limite de percepção sensorial em água (30 ng/L) [54], que é a concentração mínima necessária para ser possível a percepção sensorial da presença de determinado composto [55].

Com o objectivo de quantificar este composto nos sais em que foi identificado, foi construída uma curva de calibração por aplicação da metodologia de SPME-GC-MS implementada para a análise de sal.

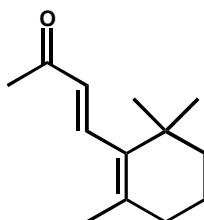


Figura 4.8 – Estrutura molecular da β -ionona.

Foram analisadas soluções padrão de β -ionona numa gama de concentrações entre 16 e 568 ng/L. As áreas cromatográficas do pico da β -ionona foram obtidas por extracção do ião 177 (m/z) (Figura 4.9). A curva de calibração está representada na Figura 4.10 e os dados obtidos a partir desta estão na Tabela 4.6.

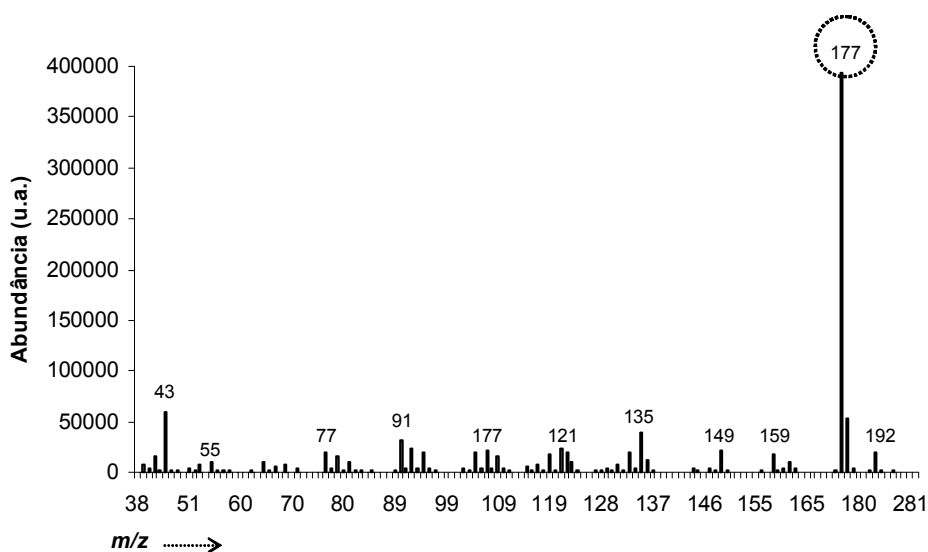


Figura 4.9 – Espectro de massa do padrão de β -ionona. (u.a.) – unidades arbitrárias

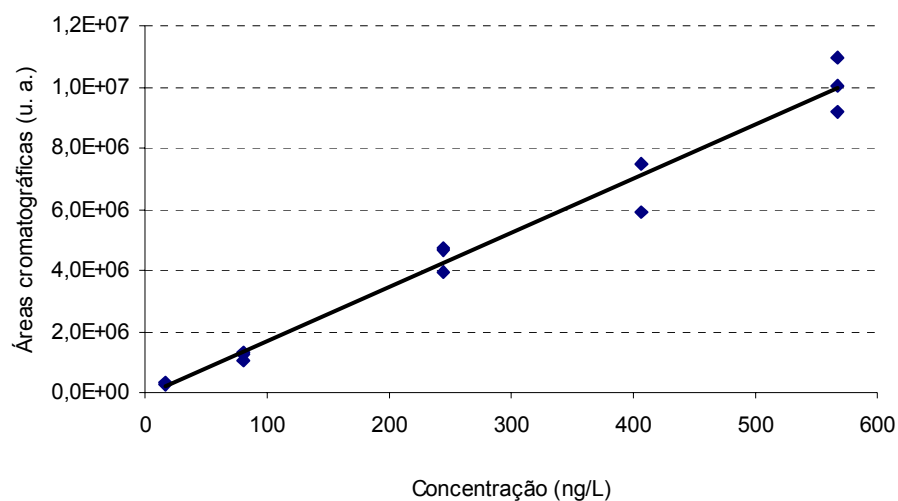


Figura 4.10 – Curva de calibração para a β -ionona construída pela aplicação da metodologia de SPME-GC-MS desenvolvida para a análise da composição volátil do sal.
(u.a) – unidades arbitrárias

Tabela 4.6 – Dados obtidos a partir da curva de calibração apresentada na Figura 4.10.

Equação da curva	$y = 17691x - 94808$
R^2	0,9779
Gama de linearidade do método	16 a 568 ng/L
Limite de detecção (LD)	4,9 ng/L
Limite de quantificação (LQ)	16,4 ng/L

A partir da equação da curva de calibração e das áreas cromatográficas correspondentes aos picos de β -ionona no sal, obtidas por extracção do ião 177 (m/z), determinou-se a concentração deste composto, em micrograma por quilograma de sal sólido ($\mu\text{g/kg}$), nos sais analisados. Esta informação encontra-se na Tabela 4.7. Não foi possível quantificar o composto β -ionona no sal de Aveiro das marinhas Desgarrada e 18 Carmonetes visto as áreas cromatográficas serem muito pequenas.

A estimativa da concentração de β -ionona nos sais analisados variou entre 0,2 $\mu\text{g/kg}$, observada para o sal de Aveiro da marinha Senitra, e 0,9 $\mu\text{g/kg}$, observada para o sal de Aveiro da marinha Caniceira. Atendendo a estes valores, se se dissolver 100 g de

sal marinho de Aveiro que contenha 0,5 µg/kg de β-ionona num litro de água, teremos uma solução que contém 50 ng/L de β-ionona. Estando este valor acima do limite de precepção sensorial para a β-ionona, é possível que esta solução apresente um aroma a violeta tal como era referido pelos anciãos marenotos em relação ao sal de Aveiro.

Tabela 4.7 – Concentração de β-ionona em µg/kg de sal, calculada a partir da curva de calibração.

			Concent. de β-ionona (µg/kg)
ORIGEM DO SAL MARINHO	AVEIRO	Desgarrada	< LQ
		18 Carmonetes	< LQ
		Passã (2004)	0,5
		Passã	0,4
		Podre	0,4
		Caniceira	0,9
		Senitra	0,2
		Peijota	0,8
		Grã Caravela	0,4
		Santiago da Fonte	0,6
	OUTRAS ORIGENS	Castro Marim	-
		Tavira	-
		Guérande	0,5
		Ilha do Sal	0,3
		Espanha	-

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia de SPME-GC-MS que permitiu detectar e identificar compostos voláteis e semi-voláteis no sal. Na fase de optimização da metodologia concluiu-se que a libertação destes compostos era favorecida pela dissolução do sal em água, explicada pela possibilidade de parte destes compostos se encontrarem retidos nos cristais de sal. O aumento da temperatura de extracção também mostrou ser favorável à libertação de compostos voláteis e semi-voláteis do sal. Quanto à massa de amostra a usar na preparação das soluções aquosas saturadas, concluiu-se não haver diferenças significativas entre 16 e 25 g. Sendo assim, com base nos resultados obtidos no desenvolvimento desta metodologia conclui-se que as condições experimentais adequadas para a análise da composição volátil do sal são as seguintes: num frasco de 120 mL, adicionar 40 mL de solução aquosa saturada com 16 g de amostra de sal e termostatizá-la a 60°C, sob agitação constante (500 r.p.m.). Após um período de 18 h de tempo de espaço de cabeça a fase estacionária da fibra de SPME (CW-DVB) é exposta à fase de vapor da amostra por um período de 90 min após o qual sofre desorção num injector de um GC-MS, durante 15 min.

Nos sais das diferentes origens analisados foram identificados compostos das seguintes famílias: hidrocarbonetos, álcoois, fenóis, aldeídos, cetonas, ésteres, compostos terpénicos e norisoprenóides. Em média, o sal marinho de Aveiro apresentou um maior número de famílias e de compostos identificados, relativamente aos sais provenientes de outras origens. Para este sal os hidrocarbonetos e os ésteres foram os que mais contribuíram para a área cromatográfica total. Os grupos de compostos que mais contribuíram para a área cromatográfica total dos sais de Castro Marim, Tavira e Ilha do Sal foram os ésteres, do sal de Guérande foram os hidrocarbonetos e do sal de Espanha foram os álcoois e fenóis juntamente com os ésteres. De entre os compostos voláteis encontrados no sal é importante referir que o hidrocarboneto 8-heptadeceno, o álcool 2-etil-1-hexanol, as cetonas 2,2,6-trimetil-ciclo-hexanona, 6-metil-2-heptanona e acetiletetrametiltetralina, o éster di-hidrometiljasmonato e os norisoprenóides 6-metil-5-hepteno-2-ona, α -ionona e β -ionona, foram compostos identificados no sal de todas ou praticamente todas as marinhas de Aveiro e em pelo menos um dos sais de outras origens. O norisoprenóide 6-metil-5-hepteno-2-ona foi o único composto identificado em todos os sais analisados. O sal de Espanha foi o que apresentou uma menor área cromatográfica total, o que se explica por se tratar de sal de mina.

O sal marinho de Guérande e o sal de referência (99,5% NaCl) foram os que mais se distinguiram dos restantes tendo em conta a análise por componentes principais (PCA) realizada aos cromatogramas de todos os sais em estudo. Os composto terpénico viridiflorol e os hidrocarbonetos n.i. (m/z 57, 71, 43, 85, 113, 99, 183, 127, 207) e n.i. (m/z 57, 71, 85, 43, 113, 127, 99) foram considerados como potenciais marcadores do sal marinho de Guérande, sendo responsáveis pela distinção deste sal nos mapas de coordenadas factoriais resultantes da análise por componentes principais (PCA).

Os compostos identificados nos sais analisados parecem ter basicamente 3 origens: i) algas marinhas, ii) comunidade bacteriana envolvente e iii) poluição do meio. Estes compostos, provenientes da envolvente das salinas, estão presentes ao longo de todo o processo de cristalização do sal. À medida que o sal marinho cristaliza numa salina estes compostos vão ficando retidos nos seus cristais.

A quantificação do composto β -ionona nas amostras de sal em que este foi identificado revelou uma presença de 0,2 a 0,9 micrograma de β -ionona por quilograma de sal. De acordo com o limite de percepção sensorial deste composto em água, soluções aquosas que contenham mais que 100 g/L de sal marinho, originam soluções que podem apresentar aroma a violeta, como se passa nos tanques de cristalização das marinhas.

❖ TRABALHO FUTURO

Num trabalho futuro será possível aplicar a metodologia agora desenvolvida para, de uma forma sistemática e aprofundada pesquisar os potenciais marcadores que permitam avaliar a envolvente ambiental do salgado e identificar a origem do sal com base na sua composição volátil.

6. BIBLIOGRAFIA

-
- [1] Ravishankar, S.; Juneja, V. K., Sodium chloride. *In: Naidu, A. S., Natural Food Antimicrobial Systems*, CRC Press LLC, Califórnia, 2000, Capítulo 26 – Secção VI.
- [2] Vieira, M. N., *Ecologia das salinas*, Instituto de Zoologia «Dr. Augusto Nobre», Universidade do Porto, 1989, 1-33.
- [3] Morgado, F.; Seixas, J.; Magalhães, F., *Nos caminhos do Sal*, Comissão de Coordenação da Região de Lisboa e Vale do Tejo, Lisboa, 1998, 11-22.
- [4] Navalho, J., SALT – The Artisans. *In: Kummer, C., The pleasures of Slow Food – Celebrating Authentic Traditions, Flavors and Recipes*, Chronicle Books, São Francisco – USA, 2002, 46-49.
- [5] Proposta de decreto-lei de 20 de Outubro de 2005 relativa às ‘Características físico-químicas e organolépticas do sal alimentar tal qual’.
- [6] Silva, I.; Ferreira, S.; Almeida, A. C.; Rocha, S. M.; Duarte, A.; Mendo, S. e Coimbra, M. A. (2005) Caracterização química e microbiológica do sal marinho de Aveiro, Universidade de Aveiro, 2005. Relatório realizado no âmbito do projecto SAL “Sal do Atlântico”.
- [7] Davis, J. S. (2000) Structure, Function, and Management of the Biological System for Seasonal Solar Saltworks - Review, *Global Nest: the Int. J.*, 3, 217-226.
- [8] Fourçans, A.; Oteyza, T.; Wieland, A.; Solé, A.; Diestra, E.; Bleijswijk, J.; Grimalt, J.; Kühl, M.; Esteve, I.; Muyzer, G.; Caumette, P.; Duran, R. (2004) Characterization of functional bacterial groups in a hypersaline microbial mat community (Salins-de-Giraud, Camargue, France), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 51, 55-70.
- [9] Kamenarska, Z.; Gasic, M. J.; Zlatovic, M.; Rasovic, A.; Sladic, D.; Kljajic, Z.; Stefanov, K.; Seizova, K.; Najdenski, H.; Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Popov, S. (2002) Chemical Composition of the Brown Alga *Padina pavonia* (L.) Gaill. from de Adriatic Sea, *Botanica Marina*, 45, 339-345.

-
- [10] Bordenave S.; Fourcans, A.; Blanchard, S.; Goni, M. S.; Caumette, P.; Duran, R. (2004) Structure and functional analyses of bacterial communities changes in microbial mats following petroleum exposure, *OPHELIA*, 58, 195-203.
- [11] Winterhalter, P.; Rouseff, R. L. Carotenoid-Derived Aroma Compounds: An Introduction, American Chemical Society, 2002.
- [12] Badawy, M. I.; Abou-Waly, H. F.; Ali, G. H. (1999) Excretion products of algae and their occurrence in Solar Lake. Taba, Egypt. *Int. J. Environ. Health Res.*, 9, 233-243.
- [13] Kambourova, R., Bankova, V., Petkov, G. (2003) Volatile Substances of the Green Alga *Scenedesmus incrassatulus*, *Z. Naturforsch.*, 58c, 187-190.
- [14] Zhang, Z.; Pawliszyn, J. (1993) Headspace Solid-Phase Microextraction, *Anal. Chem.*, 65, 1843-1852.
- [15] Belardi, R.; Pawliszyn, J. (1989) The application of chemically modified fused silica fibers in extraction of organics from water matrix samples, and their rapid transfer to capillary column, *Water Pollut. Res. J. Can.*, 24, 179-191.
- [16] Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. (1990) Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused optical fibers, *Anal. Chem.*, 62, 2145-2148.
- [17] Arthur, C. L.; Killam, L. M.; Buchholz, K. D.; Pawliszyn, J. (1992) Automation and Optimization of Solid-Phase Microextraction, *Anal. Chem.*, 64, 1960-1966.
- [18] Lord, H. L.; Pawliszyn, J. (2000) Evolution of solid-phase microextraction technology-Review, *J. Chromatogr. A*, 885, 153-193.
- [19] Alpendurada, F. M. (2000) Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis – Review, *J. Chromatogr. A*, 889, 3-14.
- [20] Rocha, S. M.; Coutinho, P.; Barros, A.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. (2006) Rapid tool for distinction of wines based on the global volatile signature, *J. Chromatogr. A*, 1114, 188-197.

-
- [21] Rocha, S.; Ramalheira, V.; Barros, A.; Delgadillo, I., Coimbra, M. A. (2001) Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Relative Response Factors in a Wine Model, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5142-5151.
- [22] Yang, X.; Peppard, T. (1994) Solid-Phase Microextraction for Flavor Analysis, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1925-1930.
- [23] Kitson, F. G.; Larsen, B. S.; McEwen, C. N. *Gas chromatography and Mass spectrometry – A practical guide*, Academic Press, 1996, Capítulos 1 e 3.
- [24] Koloff, I. M.; Sandell, E. B.; Meehan, E. J.; Bruckenstein, S. *Quantitative Chemical Analysis*, 4ª edição, Macmillan, New York, 1969, Capítulo 23.
- [25] Banca, G.; Duarte, A.; Mendo, S.; Coimbra, M. A., Caracterização preliminar da constituição química e microbiológica do sal da Figueira da Foz, Universidade de Aveiro, 2001/2002.
- [26] Ohlweiler, O., *Química Analítica Quantitativa*, Vol. 2, 3ªed., Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro, 1981, 122-124.
- [27] Pillonel, L.; Bosset, J. O.; Tabacchi, R. (2002) Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A Review, *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, 35, 1-14.
- [28] Zeb, A.; Mehmood, S. (2004). Carotenoids contents from various sources and their potential health applications, *Pakistan J. Nutr.*, 3, 199-204.
- [29] Sartin, J. H.; Halsall, C. J., Davison, B.; Owen, S.; Hewitt, C. N. (2001) Determination of biogenic volatile organic compounds (C₈-C₁₆) in the coastal atmosphere at Mace Head, Ireland, *Anal. Chim. Acta*, 428, 61-72.
- [30] Jüttner, F. (1983) Dynamics of the Volatile Organic Substances Associated with Cyanobacteria and Algae in a Eutrophic Shallow Lake, *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 814-820.

-
- [31] Qiming, X.; Haidong, C.; Huixian, Z.; Daqiang, Y. (2006) Chemical composition of essential oils of two submerged macrophytes, *Ceratophyllum demersum* L. and *Vallisneria spiralis* L., *Flavour and Fragr. J.*, 21, 524-526.
- [32] Miersch, O.; Porzel, A.; Wasternack, C. (1999) Microbial conversion of jasmonates-hydroxylations by *Aspergillus niger*, *Phytochemistry*, 5, 1147-1152.
- [33] Kim, H. J.; Chen, F.; Wang, X.; Choi, J. H. (2006) Effect of Methyl Jasmonate on Phenolics, Isothiocyanate, and Metabolic Enzymes in Radish Sprout (*Raphanus sativus* L.), *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7263-7269.
- [34] Miková, K. *Antioxidants in food*, Woodhead Publishing Ltd., Prague Institute of Chemical Technology, 2001, Capítulo 11.
- [35] Harte, J.; Holdren, C.; Schneider, R.; Shirley, C. *Toxics A to Z. A Guide to Everyday Pollution Hazards*, University of California Press, 1991, 241.
- [36] Bendz, D.; Paxéus, N. A.; Ginn, T. R.; Loge, F. J. (2005) Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden, *J. Hazard. Mater.*, 122, 195-204.
- [37] The Flavor and Fragrance High Production Volume Chemical Consortia, Washington, 2006, pp. 2. <http://www.epa.gov/hpv/pubs/summaries/cinna/c12912tp.pdf>
- [38] Dietrich, D. R.; Hitzfeld, B. C. Bioaccumulation and Ecotoxicity of Synthetic Musks in the Aquatic Environment. In: Rimkus, G. G. *Synthetic Musk Fragrances in the Environment*, Springer-Verlag, Berlin, 2004.
- [39] Tasdemir, D.; Demirci, B.; Demirci, F.; Dönmez, A. A. ; Baser, K. H. C. ; Rüedi, P. (2003) Analysis of the Volatile Components of Five Turkish *Rhododendron* Species by Headspace Soli-Phase Microextraction and GC-MS (HS-SPME-GC-MS), *Z. Naturforsch.*, 58 c, 797-803.
- [40] Nalli, S.; Horn, O. J.; Grochowalski, A. R.; Cooper, D. G.; Nicell, J. A. (2006) Origin of 2-ethylhexanol as a VOC – Short communication, *Environ. Pollut.*, 140, 181-185.

-
- [41] Tang, B.; Isacson, U. (2005) Determination of aromatic hydrocarbons in asphalt release agents using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1069, 235-244.
- [42] Zheng, Z.; Breedveld, G.; Aagaard, P. (2001) Biodegradation of soluble aromatic compounds of jet fuel under anaerobic conditions: laboratory batch experiments, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, 572-578.
- [43] Häner, A.; Höhener, P.; Zeyer, J. (1997) Degradation of Trimethylbenzene Isomers by an Enrichment Culture under N₂O-Reducing Conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (3), 1171-1174.
- [44] Wang, Z.; Fingas, M.; Owens, E. H.; Sigouin, L.; Brown, C. E. (2001) Long-term fate and persistence of the spilled Metula oil in a marine salt marsh environment. Degradation of petroleum biomarkers., *J. Chromatogr. A*, 926, 275-290.
- [45] Ayadi, H.; Elloumi, J.; Trabelsi, M.; Chraif, I.; Hammami, M.; Boukhris M. (2002) Apport of Methods Extraction: Liquid/Liquid, CPG, CG/SM for Analysis of the Organisms Micropolluants. *Littoral 2002, The Changing Coast, EUROCOAST/EUCC, Porto – Portugal*, 185-189.
- [46] Claeson, A. S. *Volatile organic compounds from microorganisms – identification and health effects*. Medical dissertation, Umeå University, Suécia, 2006.
- [47] Saito, I.; Onuki, A.; Seta, H. (2004) Indoor air pollution by alkylphenols in Tokyo, *Indoor Air*, 14, 325-332.
- [48] Espert, A.; Heras, L. A.; Karlsson, S. (2005) Emission of possible odourous low molecular weight compounds in recycled biofibre/polypropylene composites monitored by head-space SPME-GC-MS, *Polym. Degrad. Stab.*, 90, 555-562.
- [49] Wu, T.; Damu, A. G.; Su, C.; Kuo, P. (2004) Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities - Review, *Nat. Prod. Rep.*, 21, 594-624.
- [50] Fraga, B. M. (2004) Natural sesquiterpenoids - Review, *Nat. Prod. Rep.*, 21, 669-693.

-
- [51] Tellez, M.; Estell, R.; Fredrickson, E.; Powell, J.; Wedge, D.; Schrader, K.; Kobaisy, M. (2001) Extracts of *Flourensia cernua* (L): Volatile Constituents and Antifungal, Antialgal, and Antitermite Bioactivities, *J. Chem. Ecol.*, 27, 2263-2273.
- [52] Rukachaisirikul, V.; Kaewbumrung, C.; Phongpaichit S.; Hajiwangoh, Z. (2005) Eudesmane sesquiterpenes from the aquatic fungus *Beltrania rhombica*, *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 238-240.
- [53] Bomhard, E. M.; Brendler-Schwaab, S. Y.; Freyberger, A.; Herbold, B. A.; Leser, K. H.; Richter, M. (2002) *O*-Phenylphenol and its Sodium and Potassium Salts: A Toxicological Assessment, *Crit. Rev. Toxicol.*, 32, 551-626.
- [54] Buttery, R.; Ling, L. C. (1995) Volatile Flavor Components of Corn Tortillas and Related Products, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1878-1882.
- [55] Belitz, H. -D.; Grosch, W.; Schieberle, P. Food Chemistry, 3rd Revised Edition; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 2004, Capítulo 5, pp. 342.

ANEXOS

ANEXO I

**PROPOSTA DE DECRETO-LEI DE 20 DE OUTUBRO DE 2005 RELATIVA ÀS ‘CARACTERÍSTICAS
FÍSICO-QUÍMICAS E ORGANOLÉPTICAS DO SAL ALIMENTAR TAL QUAL’**

ANEXO I
DA PORTARIA SAL ALIMENTAR TAL QUAL
(a que se refere o nº3º)

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E
ORGANOLÉPTICAS DO SAL ALIMENTAR TAL QUAL

Proposta de 20.10.2005

1. SAL DESTINADO AO CONSUMIDOR FINAL

1.1. Sal marinho (Flor de Sal e Outro Tipo de Sal proveniente de salinas tradicionais)

a) Físico-químicas

(i) Do produto seco:

Cloretos, expressos em cloreto de sódio (NaCl) – 94 por cento (mínimo)

Contaminantes – limites estabelecidos no Reg. (CE) nº 466/2001 e no Codex Alimentarius

(ii) Do produto tal qual:

Humidade: Máximo de 8% para a Flor de Sal;

Máximo de 6% para o Outro tipo de Sal

b) Organolépticas

Aspecto: limpo e isento de impurezas estranhas ao sal

Cor: branca e brilhante

Aroma: característico

Sabor: característico

Textura: Flor de sal – pequenos cristais dispostos em palhetas, frágeis e fáceis de desfazer com os dedos; Outro tipo de sal – cristais mais compactados que não partem facilmente com os dedos

1.2. Sal de fontes salinas

a) Físico-químicas

(i) Do produto seco:

Cloretos, expressos em cloreto de sódio (NaCl) – 97 por cento (mínimo)

Contaminantes – limites estabelecidos no Reg. (CE) nº 466/2001

(ii) Do produto tal qual:

Humidade: Máximo de 4%.

ANEXO II

**ENSAIOS REALIZADOS NA OPTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE SPME-GC-MS PARA A
ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DE SAL MARINHO**

Tabela I – Ensaios 5-10; Efeito da massa de amostra e da temperatura de extração na análise da composição volátil, por SPME-GC-MS, de soluções aquosas saturadas com sal da marinha Peijota 2004

Pico nº	COMPOSTOS IDENTIFICADOS	Área cromatográfica (x10 ⁵)																	
		16 ^o						25 ^o											
		40°C			50°C			60°C			40°C			50°C			60°C		
		1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.
22	Pentadecano	-	-	3,90	6,43	9,47	9,29	7,93	9,87	10,44	-	-	-	3,28	3,28	4,55	5,85	7,16	9,91
30	Heptadecano	-	-	-	5,05	8,96	7,89	10,63	14,13	15,21	-	-	-	2,99	2,28	3,03	9,36	10,84	6,87
31	8-Heptadeceno	8,25	40,95	55,41	83,59	82,60	95,35	86,43	101,30	108,77	27,44	20,14	33,13	45,29	47,25	64,46	79,76	80,27	114,42
	Subtotal (área cromatográfica)	8,25	40,95	59,31	95,06	101,03	112,52	104,99	125,30	134,42	27,44	20,14	33,13	51,56	52,81	72,04	94,97	98,27	131,20
	Subtotal (%)	32,69	57,05	52,90	54,15	52,52	52,96	49,24	49,54	60,65	43,91	36,18	76,43	35,85	38,21	39,05	37,70	40,20	61,18
17	3-Octanol	-	-	-	-	-	0,44	0,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	2-(1,1-Dimetiletil)-fenol	4,15	3,91	9,18	8,65	8,39	9,46	5,74	6,22	-	8,26	8,44	-	13,94	11,96	17,50	11,16	10,93	-
50	2-(1,1-Dimetiletil)-fenol	8,94	9,16	18,16	20,73	22,57	24,51	17,45	18,19	-	15,96	16,37	-	33,71	29,37	44,41	34,56	33,34	-
	Subtotal (área cromatográfica)	13,09	13,06	27,33	29,38	30,96	34,41	23,60	24,41	0,00	24,22	24,81	0,00	47,65	41,33	61,91	45,72	44,28	0,00
	Subtotal (%)	51,86	18,20	24,38	16,74	16,10	16,20	11,07	9,65	0,00	38,76	44,56	0,00	33,13	29,91	33,56	18,15	18,11	0,00
7	6-Metil-2-heptanona	0,80	1,08	1,38	0,64	0,65	1,08	0,70	0,72	0,61	0,89	0,98	1,82	0,84	0,96	1,47	0,70	0,98	1,01
9	3-Octanona	-	7,34	-	-	2,88	10,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	2,6-Trimetil-ciclo-hexanona	0,65	0,71	0,64	0,82	0,75	0,57	0,68	0,63	0,48	0,80	0,87	0,89	1,27	1,31	1,87	0,80	0,87	0,81
16	α-Isoforona	-	-	0,41	0,29	0,31	0,42	0,31	0,28	0,26	0,25	0,29	0,39	0,38	0,40	0,61	0,51	0,45	0,32
28	6,10-Dimetil-2-undecanona	-	-	-	5,50	7,03	5,09	7,61	8,15	5,73	-	-	-	3,69	3,54	4,95	4,27	7,89	5,13
44	6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	-	-	7,83	17,04	22,68	25,35	33,54	58,23	35,68	-	-	-	13,15	8,74	-	51,88	44,20	42,37
	Subtotal (área cromatográfica)	1,44	9,13	10,26	24,29	34,31	42,78	42,83	68,00	42,76	1,94	2,13	3,11	19,33	14,94	8,90	58,17	54,38	49,64
	Subtotal (%)	5,72	12,72	9,15	13,83	17,83	20,14	20,09	26,89	19,29	3,11	3,83	7,17	13,44	10,81	4,83	23,09	22,25	23,15
57	Pirróis e Aminas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	Benzopirrol (Indol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Difenilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Subtotal (área cromatográfica)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	21,81	0,00	0,00	0,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Subtotal (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,84	0,00	0,00	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Compostos Terpênicos e Norisoprenóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1,8-Cineol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	1,45	-	-	1,35
13	6-Metil-5-hepteno-2-ona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20	0,40	-	-	-
24	β-Ciclocitral	-	-	-	1,47	1,66	1,96	2,56	2,19	2,43	-	-	-	-	6,26	8,38	1,91	2,63	1,98
34	α-Ionona	1,23	2,74	3,52	6,50	6,44	5,74	7,82	6,77	7,09	2,41	2,44	3,03	5,24	5,41	9,61	7,78	8,95	8,58
37	β-Ionona	1,22	3,15	6,02	8,31	9,42	7,94	13,72	13,22	13,12	1,31	1,59	2,07	5,19	5,03	6,12	12,09	10,36	10,33
39	trans-β-Ionona-5,6-epóxido	-	-	-	2,65	-	-	6,90	4,46	-	-	-	-	13,23	10,40	13,42	8,45	9,16	8,03
52	Di-hidroactinidiolida	-	2,74	4,78	7,89	8,53	7,10	10,79	8,57	-	5,16	4,56	-	1,53	1,70	2,27	22,81	16,43	3,33
	Subtotal (área cromatográfica)	2,46	8,63	15,21	26,82	26,06	22,74	41,78	35,21	22,63	8,88	8,59	5,10	25,28	29,12	41,65	53,04	47,53	33,60
	Subtotal (%)	9,73	12,02	13,57	15,28	13,55	10,70	19,60	13,92	10,21	14,22	15,43	14,21	17,58	21,07	22,57	21,06	19,44	15,67
	Totais	25,24	71,77	112,12	175,55	192,35	212,46	213,20	252,93	221,63	62,49	55,67	43,34	143,81	138,20	184,50	251,90	244,46	214,44

Tabela II – Ensaios 11, 12 e 13; Efeito do modo de apresentação da amostra na análise da composição do sal Pejota 2005 por SPME-GC-MS. Análise de sal p.a. em solução aquosa (referência); compostos organizados por grupos químicos.

Pico nº	COMPOSTOS IDENTIFICADOS	Áreas cromatográficas (x10 ⁻⁶)								
		Sal p.a. (99,5% NaCl)			Sal marinho					
		Sol. Aquosa sat.			Sólido			Sol. Aquosa sat.		
		16 α			35 α			16 α		
		1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.
Hidrocarbonetos										
22	Pentadecano	-	-	-	-	-	-	22,15	12,06	31,22
30	Heptadecano	-	-	-	-	-	-	15,33	9,61	10,92
31	8-Heptadeceno	-	-	-	79,71	76,10	89,76	435,20	273,44	302,15
32	Heptadecadieno	-	-	-	-	-	-	21,82	15,45	16,60
46	1,3-Dimetil-1,3-difenilciclo- butano	2,45	4,89	3,46	-	-	-	-	-	-
	Subtotal (área cromatográfica)	2,45	4,89	3,46	79,71	76,10	89,76	494,51	310,55	360,89
	Subtotal (%)	0,98	2,22	1,94	21,67	23,90	13,17	44,87	30,50	70,11
Álcoois e Fenóis										
17	3-Octanol	11,50	0,62	2,30	-	-	-	-	-	-
20	2-Etil-1-hexanol	-	-	-	-	-	-	1,67	1,17	-
40	2-Metil-1-dodecanol	-	-	-	-	-	-	3,02	5,63	-
36	BHT	vt	vt	-	-	-	-	-	-	-
53	2,4-bis(1,1-Dimetiletil)-fenol	2,58	6,36	3,02	-	-	-	-	-	-
	Subtotal (área cromatográfica)	14,08	6,98	5,32	0,00	0,00	0,00	4,69	6,80	0,00
	Subtotal (%)	5,61	3,17	2,98	0,00	0,00	0,00	0,43	0,67	0,00
Aldeídos e Cetonas										
11	Octanal	2,73	1,05	0,84	-	-	-	1,28	1,17	1,94
15	Nonanal	16,92	5,01	5,82	-	-	-	4,81	7,09	14,90
21	Decanal	66,69	7,89	8,43	-	-	-	-	-	-
54	α-Hexilcinamaldeído	-	-	-	8,10	7,21	4,04	5,44	5,00	2,78
60	BHT-aldeído	2,27	4,29	6,26	-	-	-	1,16	3,13	0,00
7	6-Metil-2-heptanona	-	-	-	0,22	0,24	0,33	0,38	0,26	0,00
12	2,2,6-Trimetil-ciclo-hexanona	-	-	-	0,25	0,28	0,25	4,03	3,37	3,58
23	2-Undecanona	1,68	5,64	3,82	-	-	-	-	-	-
28	6,10-Dimetil-2-undecanona	-	-	-	-	2,27	1,53	0,22	0,14	0,35
38	8-Pentadecanona	12,01	21,86	19,25	-	-	-	-	-	-
43	2,6-di(t-Butil)-4-hidroxi-4-metil-2,5-ciclohexadieno-1-ona	-	-	-	11,62	13,33	3,77	51,00	47,20	28,56
44	6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	-	-	-	30,59	27,45	49,27	4,05	4,97	0,71
45	3,4-Di-hidro-3,3,6,8-tetrametil-1(2H)-naftalenona	5,48	10,15	9,44	-	-	-	-	-	-
56	Acetiletiltetrametiltetralina	-	-	-	4,79	2,73	-	23,79	88,04	4,13
59	Difenil-metanona (Benzofenona)	28,23	39,54	42,04	-	-	-	-	-	-
	Subtotal (área cromatográfica)	136,02	95,43	95,90	55,57	53,51	59,19	96,14	160,38	56,94
	Subtotal (%)	54,15	43,32	53,65	15,11	16,80	8,68	8,72	15,75	11,06
Ésteres e Tinóteres										
6	Hexanoato de etilo	1,40	-	-	-	-	-	0,46	-	-
18	Octanoato de etilo	51,17	5,33	3,35	-	-	-	4,96	7,30	15,79
27	Decanoato de etilo	6,25	7,67	-	-	-	-	5,83	1,30	4,52
42	Miristato de isopropilo	4,48	42,45	19,44	34,24	20,47	7,55	35,79	38,47	7,65
51	Di-hidrometiljasmonato	-	-	-	15,12	9,08	3,83	11,39	9,02	2,62
55	Ftalato de etilo	1,77	3,59	11,58	46,09	27,96	410,65	10,14	16,00	4,18
61	Ftalato de isobutilo	33,57	48,12	35,70	-	-	-	247,83	274,20	16,15
64	Ftalato de butilo	-	-	-	54,63	26,66	26,79	151,29	160,96	12,07
14	2,3,4-Tritiapentano	-	-	-	-	0,31	-	-	-	-
	Subtotal (área cromatográfica)	98,64	107,17	70,07	150,08	84,48	448,82	467,69	507,25	62,99
	Subtotal (%)	39,27	48,65	39,21	40,80	26,53	65,84	42,43	49,82	12,24
Compostos Terpênicos e Norisorenóides										
5	1,8-Cineol	-	-	-	-	-	-	0,34	-	-
8	p-Cimeno	-	-	-	-	-	-	1,25	1,43	1,95
13	6-Metil-5-hepteno-2-ona	-	-	-	-	-	-	0,41	0,27	0,86
24	β-Ciclocitral	-	-	-	3,01	3,00	2,69	-	-	-
34	α-Ionona	-	-	-	5,94	5,71	7,88	5,81	6,07	5,40
35	Geranil acetona	-	5,81	3,98	-	-	-	17,97	13,41	13,07
37	β-Ionona	-	-	-	9,24	27,20	17,68	13,40	11,92	12,62
52	Di-hidroactinidiolida	-	-	-	60,30	64,73	51,04	-	-	-
58	4-Oxo-β-ionona	-	-	-	4,01	3,72	4,66	-	-	-
	Subtotal (área cromatográfica)	0,00	5,81	3,98	82,50	104,36	83,95	39,19	33,10	33,90
	Subtotal (%)	0,00	2,64	2,23	22,43	32,77	12,31	3,56	3,25	6,59
Totais		251.19	220.29	178.73	367.86	318.45	681.72	1102.22	1018.07	514.73

ANEXO III

**COMPOSTOS VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS IDENTIFICADOS NO ESPAÇO DE CABEÇA DO SAL
MARINHO DE AVEIRO POR SPME-GC-MS**

Pico n°	COMPOSTOS IDENTIFICADOS	Áreas cromatográficas (×10 ⁻⁶)																	
		Desgarrada			18 Carmonetes			Passá (2004)			Passá (2005)			Podre			Caniceira		
		1ºensaio	2ºensaio	3ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	3ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	3ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	3ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	3ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	3ºensaio
5	1,8-Cineole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,28	0,07	-	-	-	-	-	-	-
8	p-Cimeno	0,33	-	vt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	6-Metil-5-hepten-2-ona	1,12	1,97	0,77	0,34	0,79	0,55	2,88	2,66	3,09	1,06	1,62	1,94	3,93	3,60	6,42	1,98	2,57	1,23
24	β-Ciclocitral	0,27	0,44	-	-	-	-	1,62	1,30	1,65	-	-	-	1,39	1,45	1,30	2,33	2,13	2,31
34	α-Ionona	1,18	0,95	0,86	-	-	-	7,34	4,64	5,90	1,87	2,12	2,12	3,69	3,61	3,23	7,65	6,25	7,82
37	β-Ionona	4,13	3,84	2,01	1,76	1,56	2,27	13,30	13,49	13,38	7,17	8,44	10,50	10,64	11,94	12,21	18,12	19,97	16,51
	Subtotal (área cromatográfica)	7,03	7,20	3,64	2,09	2,35	2,82	25,50	22,26	24,16	21,11	22,22	14,65	19,64	20,61	23,16	30,09	30,92	27,86
	Subtotal (%)	8,73	7,24	5,83	0,50	0,77	0,89	14,11	14,75	13,59	3,28	3,61	3,93	13,60	15,66	17,25	25,73	24,10	22,21
	Totais	80,52	99,43	62,44	415,23	306,29	318,14	180,75	150,89	177,78	154,16	195,80	242,84	144,37	131,58	134,27	116,92	128,29	125,42

Tabela III (cont.) – Compostos voláteis identificados no espaço de cabeça do sal marinho de Aveiro por SPME-GC-MS e respectivas áreas cromatográficas.

Pico nº	COMPOSTOS IDENTIFICADOS	Áreas cromatográficas (×10 ⁻⁶)											
		Senitra			Peijota			Grã Caravela			Santiago da Fonte		
		1ºensaio	2ºensaio	3ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	3ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	3ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	3ºensaio
Hidrocarbonetos													
1	Decano	-	-	-	-	-	-	1,70	-	0,56	-	-	-
4	Dodecano	-	-	-	-	-	-	5,92	2,08	2,91	-	-	-
10	1,2,4 -Trimetil-benzeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Tetradecano	-	-	-	-	-	-	7,30	-	-	-	-	-
22	Pentadecano	-	-	-	22,15	12,06	31,22	10,20	11,88	8,16	7,94	3,15	6,86
25	Hexadecano	-	-	-	-	-	-	7,34	3,14	1,53	-	-	-
30	Heptadecano	-	-	-	15,33	9,61	10,92	11,47	10,24	7,20	16,47	6,24	10,11
31	8-Heptadeceno	vt	vt	vt	435,20	273,44	302,15	144,40	140,25	114,16	125,96	63,95	84,78
32	Heptadecadieno	-	-	-	21,82	15,45	16,60	10,59	5,82	3,90	vt	vt	vt
	Subtotal (área cromatográfica)	0,00	0,00	0,00	494,51	310,55	360,89	198,91	173,40	138,42	150,37	73,34	101,75
	Subtotal (%)	0,00	0,00	0,00	49,30	36,43	79,72	69,00	62,46	43,25	59,17	31,48	34,52
Álcoois e Fenóis													
20	2-Etil-1-hexanol	0,58	0,92	4,79	1,67	1,17	-	1,35	1,24	1,13	1,77	3,98	2,28
36	BHT	vt	33,40	vt	-	vt	-	7,73	14,01	86,38	2,68	7,77	24,56
49	2-(1,1-Dimetiletil)-?-metil-fenol	1,26	vt	0,40	-	-	-	5,16	5,53	6,00	-	-	-
50	?-(1,1-Dimetiletil)-fenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Subtotal (área cromatográfica)	1,84	34,32	5,18	1,67	1,17	0,00	14,24	20,77	93,51	4,45	11,75	26,84
	Subtotal (%)	1,13	14,47	18,20	0,17	0,14	0,00	4,94	7,48	29,21	1,75	5,04	9,11
Aldeídos e Cetonas													
3	2-Etil-hexanal	2,95	2,57	4,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	α-Hexilcinamaldeído	2,38	3,30	-	5,44	5,00	2,78	1,84	2,47	1,29	3,37	4,21	1,56
3	6-Metil-2-heptanona	-	-	-	0,38	0,26	-	0,37	0,29	0,29	0,55	0,66	0,39
9	3-Octanona	-	-	-	-	-	-	0,53	-	28,90	-	-	23,82
12	2,2,6-Trimetil-ciclo-hexanona	0,11	0,11	0,13	0,22	0,14	0,35	0,29	0,18	0,14	0,17	0,37	0,14
28	6,10-Dimetil-2-undecanona	-	-	-	4,03	3,37	3,58	3,25	4,00	3,82	7,02	6,81	4,94
43	2,6-di(f-Butil)-4-hidroxi-4-metil-2,5-ciclo-hexadien-1-ona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	-	-	-	51,00	47,20	28,56	30,84	33,72	23,38	36,10	29,56	34,16
56	Acetiletiletetrametiltetralina	2,56	4,47	-	4,05	4,97	0,71	1,18	1,80	1,23	2,71	2,72	1,01
	Subtotal (área cromatográfica)	8,00	10,45	5,09	65,11	60,94	35,98	38,30	42,46	59,04	49,93	44,33	66,03
	Subtotal (%)	4,90	4,41	17,86	6,49	7,15	7,95	13,28	15,30	18,45	19,65	19,03	22,40
Ésteres													
51	Di-hidrometiljasmonato	11,98	9,07	2,45	11,39	9,02	2,62	8,07	7,87	6,41	5,03	10,48	5,62
55	Ftalato de etilo	-	-	-	10,14	16,00	4,18	-	-	-	-	-	-
61	Ftalato de isobutilo	133,76	175,95	11,06	247,83	274,20	16,15	-	-	-	-	-	-
64	Ftalato de butilo	-	-	-	151,29	160,96	12,07	14,28	19,29	11,57	27,18	67,66	84,04
	Subtotal (área cromatográfica)	145,74	185,02	13,50	420,65	460,18	35,03	22,34	27,16	17,99	32,21	78,14	89,66
	Subtotal (%)	89,35	78,02	47,42	41,93	53,98	7,74	7,75	9,78	5,62	12,67	33,54	30,42
Compostos Terpénicos e Norisoprenóides													
2	Limoneno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1,8-Cineole	0,55	0,22	-	0,34	-	-	-	-	-	-	-	-
8	p-Cimeno	-	-	-	1,25	1,43	1,95	-	-	-	0,45	0,38	-
13	6-Metil-5-hepten-2-ona	1,48	1,21	1,16	0,41	0,27	0,86	0,32	0,83	0,82	1,66	1,23	0,72
24	β-Ciclocitral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	α-Ionona	3,10	3,54	0,98	5,81	6,07	5,40	3,38	3,43	3,84	3,72	3,93	2,97
37	β-Ionona	2,40	2,38	2,56	13,40	11,92	12,62	10,79	9,55	6,45	11,33	19,85	6,81
	Subtotal (área cromatográfica)	7,52	7,35	4,70	21,21	19,69	20,83	14,50	13,81	11,11	17,16	25,39	10,51
	Subtotal (%)	4,61	3,10	16,52	2,11	2,31	4,60	5,03	4,97	3,47	6,75	10,90	3,57
Totais		163,10	237,14	28,47	1003,15	852,53	452,73	288,29	277,60	320,06	254,12	232,94	294,79

ANEXO IV

**COMPOSTOS VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS IDENTIFICADOS NO ESPAÇO DE CABEÇA DO SAL
MARINHO PROVENIENTE DE OUTRAS ORIGENS ANALISADO POR SPME-GC-MS**

Tabela IV – Compostos voláteis identificados no espaço de cabeça do sal marinho de outras origens por SPME-GC-MS e respectivas áreas cromatográficas.

Pico n°	COMPOSTOS IDENTIFICADOS	Áreas cromatográficas (×10 ⁻³)														
		Castro Marim			Tavira			Guérande			Ilha do Sal			Espanha		
		1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.
29	Hidrocarbonetos n.i. (m/z 57, 71, 43, 85, 113, 99, 183, 127, 207) 8-Heptadeceno n.i. (m/z 57, 71, 85, 43, 113, 127, 99) Subtotal (área cromatográfica) Subtotal (%)	-	-	-	-	-	-	25,44	28,19	32,50	-	-	-	-	-	-
31		-	-	-	-	-	-	39,74	27,46	22,74	-	-	-	-	-	-
33		-	-	-	-	-	-	10,20	16,00	15,26	-	-	-	-	-	-
		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	75,38	71,65	70,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	53,44	55,10	51,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	Álcoois e Fenóis 2-Etil-1-hexanol BHT 2-(1,1-Dimetil-1- β -metil-fenol o-fenilfenol Subtotal (área cromatográfica) Subtotal (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,50	0,51	-	11,98	1,44	2,11
36		0,34	1,03	2,70	vt	vt	vt	vt	vt	vt	1,74	1,12	1,12	2,71	vt	-
49		2,31	-	-	-	4,07	2,85	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62		-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,39	1,26	vt	-	-	-
		2,64	1,03	2,70	0,00	4,07	2,85	0,00	0,00	0,00	6,62	2,88	1,12	14,68	1,44	2,11
		2,04	1,35	2,54	-	1,70	1,37	0,00	0,00	0,00	6,13	2,48	1,84	31,11	7,50	16,24
3	Aldeídos e Cetonas 2-Etil-hexanal 6-Metil-2-heptanona 3-Octanona 2,2,6-Trimetil-ciclohexanona 6,10-Dimetil-2-undecanona Acetil-tetrametil-tetralina Subtotal (área cromatográfica) Subtotal (%)	-	-	-	-	-	-	1,47	1,11	1,11	-	-	-	-	-	-
7		-	-	-	-	-	-	0,97	0,83	0,85	-	-	-	-	-	-
9		-	-	-	-	-	-	vt	1,83	1,23	-	-	-	-	-	-
12		-	-	-	-	-	-	5,62	6,08	5,20	-	-	-	-	-	-
28		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,83	vt	-
		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,05	9,85	8,39	0,00	0,00	0,00	0,83	0,00	0,00
		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,71	7,58	6,09	0,00	0,00	0,00	1,77	0,00	0,00
51	Ésteres Di-hidrometiljasmonato Ftalato de etilo Ftalato de isobutilo Ftalato de butilo Subtotal (área cromatográfica) Subtotal (%)	6,29	-	-	vt	10,54	10,81	-	-	-	7,78	8,46	10,74	1,50	vt	-
55		14,24	1,73	6,78	5,17	32,89	28,66	-	-	-	14,82	18,20	12,97	2,09	1,30	vt
61		68,74	46,92	64,33	52,89	118,54	98,25	8,44	4,62	8,31	27,80	36,99	20,07	27,63	15,14	10,25
64		37,23	26,11	32,31	23,57	73,36	65,78	-	-	-	15,68	18,59	15,37	-	-	-
		126,50	74,76	103,41	81,64	235,33	203,50	8,44	4,62	8,31	66,08	82,24	59,15	31,22	16,44	10,25
		97,65	97,79	97,23	98,05	98,12	98,12	5,98	3,55	6,03	61,24	70,83	97,25	66,16	85,50	78,84
2	Compostos Terpénicos e Norisoprenóides Limoneno <i>p-cimeno</i> α -Humuleno Viridiflorol β -Eudesmol 6-Metil-5-hepteno-2-ona α -Ionona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,53	6,31	-	-	-	-
8		-	-	-	0,58	vt	0,63	-	-	-	16,85	11,52	-	0,45	1,34	0,64
26		-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,80	2,82	-	-	-	-
41		-	-	-	-	-	-	20,56	16,29	21,11	-	-	-	-	-	-
49		-	-	-	-	-	-	3,94	5,71	8,41	-	-	-	-	-	-
13		0,39	0,66	0,25	1,05	0,44	0,43	vt	vt	vt	0,70	1,19	0,55	-	vt	vt
34		-	-	-	-	-	-	10,58	9,73	10,18	-	-	-	-	-	-

Pico nº	COMPOSTOS IDENTIFICADOS	Áreas cromatográficas (×10 ⁻⁶)														
		Castro Marim			Tavira			Guérande			Ilha do Sal			Espanha		
		1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.	1º ens.	2º ens.	3º ens.
37	β-Ionona	-	-	-	-	-	-	14,10	12,18	10,91	5,33	9,15	-	-	-	-
	Subtotal (área cromatográfica)	0,39	0,66	0,25	1,63	0,44	1,06	49,18	43,91	50,62	35,21	30,99	0,55	0,45	1,34	0,64
	Subtotal (%)	0,30	0,86	0,23	1,95	0,18	0,51	34,87	33,77	36,73	32,63	26,69	0,91	0,96	6,99	4,92
	Totais	129,54	76,45	106,35	83,26	239,83	207,41	141,06	130,03	137,82	107,90	116,11	60,82	47,19	19,22	13,00